

**Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da  
Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol**

**Tânia Sofia Dias Mesquita**

**Beja**

**2015**



**Instituto Politécnico de Beja**  
**Escola Superior Agrária**  
**Mestrado em Engenharia do Ambiente**

**Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da  
Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol**

**Tânia Sofia Dias Mesquita**

Dissertação de mestrado apresentado na Escola Superior Agrária de Beja do Instituto Politécnico de Beja para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente

**Orientadora:** Doutora Maria da Conceição Fernandes

**Coorientador:** Prof. Doutor Humberto Chaves





## *Agradecimentos*

À minha orientadora Dra. Conceição Fernandes agradeço toda a ajuda e disponibilidade no decorrer de todo o estágio.

Ao coorientador Prof. Humberto Chaves agradeço toda a disponibilidade prestada.

Ao Miguel, à Ana Paulino, ao Mathew, ao Max, à Flávia e à Susana por toda a ajuda que me foram dando durante o trabalho.

A todo o CEBAL por me terem acolhido e terem aceite a minha colaboração..

Aos meus pais que me ajudaram bastante durante o mestrado, e que sem eles nada teria sido possível.

Ao Rui por todo o apoio e ajuda ao longo deste percurso.

A todos, um muito Obrigada!



## ***Resumo***

*Opuntia ficus indica* é uma planta conhecida em Portugal como figueira-da-índia, piteira, ou palma, que pertence à família das cactáceas. É uma cultura de cato domesticado desde tempos muito antigos, que é importante, a nível mundial, para as economias agrícolas nas zonas áridas e semiáridas. O figo da índia tem atraído a atenção dos consumidores devido às suas propriedades nutricionais e antioxidantes, no entanto os picos presentes na casca constitui um entrave ao seu consumo. Assim, a produção de sumos e compotas pode ser uma boa abordagem para aumentar o consumo deste fruto. Num perspectiva de valorização integrada, a produção de sumos e compotas provenientes do figo-da-índia gera em grandes quantidades dois tipos de resíduos, a casca e as sementes. As sementes do figo da índia são usadas para a extração de óleos, que pode ser usado na indústria cosmética.

No presente trabalho desenvolveram-se estudos para o aproveitamento dos resíduos resultantes da produção da polpa de figo da índia e da produção do óleo das sementes. Foram elaborados vários ensaios sobre as duas biomassas, no entanto visto que a casca apresentou maior quantidade de açúcar foi necessário retirar o mesmo para não existirem os falsos resultados, nem grandes quantidades de inibidores. À semente foram retiradas as pectinas para alguns ensaios, uma vez que depois de arrefecida a pectina queria uma espécie de gelatina, o que torna a filtração quase impossível.

Dos ensaios que foram realizados, o micro-ondas não obteve resultados tão vantajosos quanto os restantes, para ambas as biomassas. A hidrólise ácida a 4% obteve um resultado mais vantajoso, depois deste ensaio foi realizado a sacarificação e fermentação.

Os ensaios de fermentação foram feitos com e sem enzima. Na casca notou-se que não é necessária a utilização da enzima, o valor de etanol com enzima foi de 17,1g/L e de 15,3 g/L sem enzima, enquanto que para a semente a quantidade de etanol foi superior com enzima, sendo a diferença de 2,7 g/L com enzima e 1,8 g/L sem enzima.

*Palavras-chave: Resíduo agro-industriais, sementes do figo da india, casca do figo da india, sacarificação enzimática, hidrólise ácida, fermentação, ensaios de micro-ondas.*

## ***Abstract***

*Opuntia ficus indica* is a plant known in Portugal as nopal, maguey, or palm, which belongs to the family of cacti. It is a domesticated cactus culture since ancient times, which is important, worldwide, for the agricultural economies in the arid and semi-arid areas. The Indian fig has attracted the attention of consumers due to their nutritional and antioxidant properties, however the peels in the bark is an obstacle to their consumption. Thus, the production of juices and jams can be a good approach to increase the consumption of this fruit. In a perspective of integrated enhancement, production of juices and jams from the fig-of-India generates large amounts of two residues, bark and seeds. Fig India Seeds are used for the extraction of oils which can be used in the cosmetic industry.

In this work were developed studies for the recovery of waste from the production of Indian fig pulp and production oil seeds. Several essays on the two biomasses were prepared, however as the hull presented higher amount of sugar was necessary to remove the same for there are no false results, or large amounts of inhibitors. The seed pectins have been removed for some tests, after once cooled to a kind wanted pectin jelly, which makes it nearly impossible to filter.

The tests that were performed, the microwave did not get results as advantageous as the other, for both biomass. Acid hydrolysis of the 4% obtained an advantageous result of this test was conducted after saccharification and fermentation.

The fermentation trials were performed with and without enzyme. In the skin, it was noted that the use of the enzyme is required, the amount of ethanol enzyme was 17,1g / l and 15.3 g / L no enzyme, while for the amount of the seed was greater with ethanol enzyme, the difference being 2.7 g / L enzyme and with 1.8 g / L no enzyme.

*Keywords: agro-industrial waste, fig seeds of India, Indian fig bark, enzymatic saccharification, acid hydrolysis, fermentation, microwave testing.*

## *Índice*

1. Introdução .....	4
1.1. Enquadramento / Problemática.....	4
1.2. Objectivos.....	4
1.2.1. Objectivo geral .....	4
1.2.2. Objectivos Específicos .....	4
2. Revisão bibliográfica .....	5
2.1. Conceito de bioetanol .....	5
2.2. A importância do bioetanol como combustível .....	6
2.3. O bioetanol a nível mundial .....	7
2.4. Perspetiva económica .....	8
2.5. Estrutura e composição dos materiais lenhocelulósicos.....	8
2.6. Produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica .....	10
2.6.1. Pré-tratamentos em materiais lenhocelulósicos.....	11
2.6.2. Sacarificação.....	14
2.7. O Figo-da-índia como biomassa.....	15
3. Materiais e Métodos .....	18
3.1. Caracterização .....	18
3.1.1. Determinação dos sólidos totais na biomassa.....	18
3.1.2. Determinação das cinzas na biomassa.....	18
3.1.3. Determinação dos extrativos na biomassa.....	19
3.1.4. Determinação da proteína bruta e do azoto .....	20
3.1.5. Cálculo da percentagem e sólidos insolúveis em ácido e da lenhina de Klason .....	21
3.2. Análise de açúcares, ácidos orgânicos e etanol .....	21
3.2.1. Análise por DNS.....	21
3.2.2. Análise por HPLC .....	22

3.3.	Pré-tratamentos .....	23
3.3.1.	Micro-ondas .....	23
3.3.1.1.	Ensaio preliminares .....	24
3.3.1.2.	Ensaio com ácido a 4% .....	24
3.3.2.	Hidrólise ácida diluída .....	25
3.4.	Sacarificação enzimática .....	26
3.4.1.	Cálculo da actividade enzimática sobre papel de filtro .....	26
3.4.2.	Determinação da actividade celobiase .....	27
3.4.3.	Ensaio de hidrólise enzimática .....	27
3.5.	Fermentação .....	28
5.	Resultados e discussão .....	30
5.1.	Semente .....	30
5.1.1.	Caracterização .....	30
5.1.2.	Pré-tratamento com micro-ondas .....	33
5.1.2.1.	Ensaio preliminares .....	33
5.1.2.2.	Ensaio com ácido a 4% .....	34
5.1.3.	Hidrólise ácida diluída .....	39
5.1.4.	Sacarificação enzimática .....	41
5.1.4.1.	Semente sem pré-tratamento .....	41
5.1.4.2.	Semente pré-tratada com micro-ondas .....	42
5.1.5.	Fermentação .....	46
5.2.	Casca .....	48
5.2.1.	Preparação .....	48
5.2.3.1.	Testes preliminares com micro-ondas .....	51
5.2.3.2.	Hidrólise ácida diluída .....	52
5.2.4.	Sacarificação enzimática .....	53
5.2.4.1.	Casca seca .....	53

5.2.4.2. Casca lavada com água.....	53
5.2.4.3. Casca lavada com água e seca .....	54
5.2.5. Fermentação.....	55
6. Conclusões.....	57
Bibliografia.....	59
Anexos.....	62

## *Índice de Tabelas*

Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens dos processos de pré-tratamento: Hidrólise ácida e radiação micro-ondas <sup>19,21-24</sup> .....	14
Tabela 3.1 – Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC.....	23
Tabela 5.1 – Teores de humidade, cinzas, extratáveis em água, extratáveis em etanol, proteína bruta e de azoto total presentes na semente (em percentagem).....	32
Tabela.5.2 – Caracterização da semente livre de extrativos (g/L).....	32
Tabela 5.3 - Composição em g/L do licor resultante do ensaio em micro-ondas com potência 119W durante 5 minutos com ácido, base e água. ....	34
Tabela 5.4 - Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas durante 5 e 10 minutos na potência 539W e com o volume 125 mL .....	36
Tabela 5.5 – Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas nas potências PMA (539 W) e PA (700 W) durante 5 minutos e com 125 mL de volume..	37
Tabela 5.6- – Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas com 250 e 125 mL de volume, em 5 minutos de radiação e 539 W de potência.....	38
Tabela 5.7 - – Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas com 500 e 125 mL de volume, 539 W de potência durante 10 minutos.....	39
Tabela 5.8 – Composição dos licores resultantes do estudo da hidrólise ácida diluída a 4%.....	40
Tabela 5.9 – Concentração de glucose,xilose e arabinose na sacarificação da semente sem pectinas e na semente tal e qual ao fim de 72h .....	42
Tabela 5.10 – Concentração de glucose, xilose e arabinose obtidos com a sacarificação da semente pré-tratada com micro-ondas a PMA durante 5 e 10 minutos .....	43
Tabela 5.11 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose obtidos com a sacarificação da semente pré-tratada em micro-ondas com potências diferentes, com o mesmo volume e durante o mesmo tempo. ....	44
Tabela 5.12 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose obtida com a sacariificação da semente pré-tratada em micro-ondas a 700W com diferentes volumes, 250 e 125 mL. ....	45
Tabela 5.13 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose obtida com a sacarificação da semente pré-tratada em micro-ondas com diferentes volumes, 500 e 125mL e tempo de tratamento. ....	45



Tabela 5.14 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose resultante da sacarificação do sólido da hidrólise ácida diluída .....	46
Tabela 5.15 – Concentração de etanol e eficiência da fermentação obtidos no processo de fermentação com <i>S. cerevisiae</i> NCYC-1119 .....	47
Tabela 5.16 – Teores de humidade, cinzas, extratáveis em água, extratáveis em etanol, proteína e de azoto presentes na Casca A e B respectivamente. ....	49
Tabela 5.17 – Caracterização da casca A e casca B livre de extrativos em % .....	50
Tabela 5.19 – Composição em g/L do licor resultante do ensaio em micro-ondas com potência 119W durante 5 minutos com ácido, base e água. ....	51
Tabela 5.18 – Composição dos licores resultantes do estudo da hidrólise ácida diluída	52
Tabela 5.20- Concentração de etanol e eficiência da fermentação obtidos no processo de fermentação .....	56

## *Índice de figuras*

Figura 1 – Esquema da obtenção de biocombustíveis de primeira geração .....	5
Figura 2 – Esquema da obtenção de bioetanol .....	6
Figura 3 – Estrutura recalcitrante da biomassa lenhocelulósica.....	9
Figura 4- Esquema da bioconservação de energia solar em biocombustíveis (RUBIN, E; 2008).....	10
Figura 5 – Esquema dos processos para obtenção de bioetanol .....	10
Figura 6 - Esquema do efeito dos pré-tratamentos na biomassa lenhocelulósica .....	11
Figura 7 – Compostos de degradação dos diversos componentes da biomassa lenhocelulósica .....	12
Figura 8 – Fotografia da espécie <i>Opuntia ficus indica</i> .....	16
Figura 9 – a) Semente recebida; b) Semente durante o processo de moagem; c) Semente moída e peneirada (tamanho $\leq 1\text{mm}$ ).....	30
Figura 10 – Aparelho de soxhlet em série durante o ensaio de quantificação dos extrativos .....	31
Figura 11 – Representação gráfica da concentração de glucose e xilose ao longo da sacarificação .....	41
Figura 12 – Representações gráficas da concentração de glucose, frutose ou xilose e etanol na fermentação ao longo das 24h sem enzima e com enzima .....	47
Figura 13 – Representação da casca cortada em tiras; seca a 40°C e moída em partículas inferiores ou iguais a 1mm, respectivamente. ....	48
Figura 14 – Representação gráfica da concentração de glucose e frutose ao longo do ensaio da sacarificação .....	53
Figura 15 – Representação gráfica da concentração de glucose, xilose e arabinose ao longo da sacarificação da casca lavada com água .....	54
Figura 16 – Representação gráfica das concentrações de glucose e xilose às 72h da sacarificação da casca lavada com água e seca. ....	55
Figura 17 – Representação gráfica do perfil da casca seca sem e com adição de enzimas ao longo do tempo .....	56

## ***Siglas/ Abreviaturas***

**CEBAL** – Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo

**DNS** – Ácido dinitrosalicílico

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**MO** –Micro-ondas

***OFI*** – *Opuntia ficus indica*

**PA** – Potência Alta

**PM** – Potência Média

**PMA** – Potência Média Alta

**RI** – Índica de refração

**RLS** – Razão líquido sólido



## 1. Introdução

### 1.1. Enquadramento / Problemática

A cultura de *Opuntia ficus indica* - OFI tem aumentado nos últimos anos em Portugal. A produção desta planta em Portugal é essencialmente para polpas e sumos, como tal há resíduos que se formam e que precisam de ser aproveitados, neste caso a semente e a casca. Da semente é extraído o óleo que é aproveitado para cosmética. O CEBAL fez um levantamento do potencial dos resíduos da produção da polpa de figo da índia e do óleo das sementes. Neste âmbito o trabalho apresentado nesta tese reflete o estudo sobre o potencial para a produção de bioetanol.

Neste contexto, foi elaborado um plano com vários ensaios de modo a entender as diferenças entre os pré-tratamentos aplicados na biomassa para ser posteriormente utilizado na fermentação com um rendimento mais vantajoso.

### 1.2. Objectivos

#### 1.2.1. Objectivo geral

Estudar o potencial dos resíduos resultantes da produção da polpa de figo da índia e da produção do óleo das sementes para a para a produção do bioetanol.

#### 1.2.2. Objectivos Específicos

- Caracterização da casca do figo da índia e das sementes depois da extração do óleo;
- Quantificar os açúcares solúveis da casca e das sementes do figo da índia;
- Sacarificação direta com enzimas comerciais da casca e das sementes do figo da índia;
- Hidrólise ácida da casca e das sementes do figo da índia.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Conceito de bioetanol

Bioetanol, segundo o Decreto-Lei nº62/2006, é o etanol produzido a partir de biomassa ou da fracção biodegradável de resíduos para a utilização como biocombustíveis.

O grande avanço científico foi desenvolvendo novas tecnologias para a obtenção do bioetanol. Estas tecnologias dividem-se em dois conceitos; a obtenção de bioetanol de primeira geração e de segunda geração. Na obtenção de bioetanol a partir da primeira geração os açúcares simples são utilizadas directamente no processo, como por exemplo a cana-de-açúcar<sup>1</sup>. Na figura 1 está representado um esquema que exemplifica a obtenção do etanol a partir do milho e da cana-de-açúcar<sup>2</sup>.

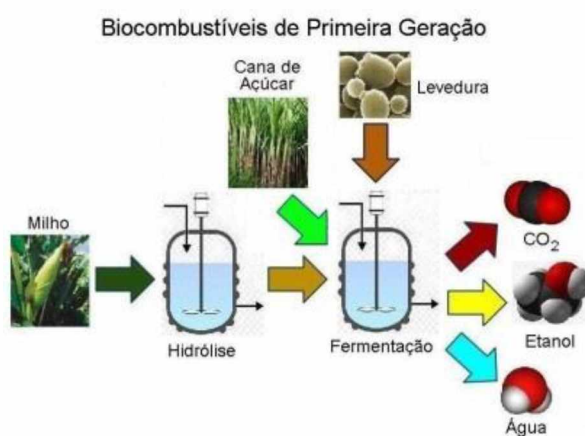


Figura 1 – Esquema da obtenção de biocombustíveis de primeira geração

A produção de etanol de segunda geração, a partir de biomassa lenhocelulósica de variadas fontes, pode representar um aumento substancial na produção de etanol, sendo mundialmente considerada a principal opção para a produção de combustível renovável alternativo à gasolina, proveniente do petróleo<sup>3</sup>.

Nas tecnologias utilizadas na segunda geração não são utilizados os açúcares simples contidos na seiva mas sim transformando a celulose em açúcares simples para posterior fermentação e produção do etanol<sup>4</sup>, e portanto são utilizados essencialmente biomassa lenhocelulósica entre os quais se encontram os resíduos. Os combustíveis de

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

segunda geração produzidos de parte de plantas são as alternativas mais benéficas para o meio ambiente<sup>1</sup>. De uma forma simplificada a celulose das plantas é misturada num reactor com levedura ou bactérias que vão fermentar produzindo etanol, como podemos observar na figura 2.

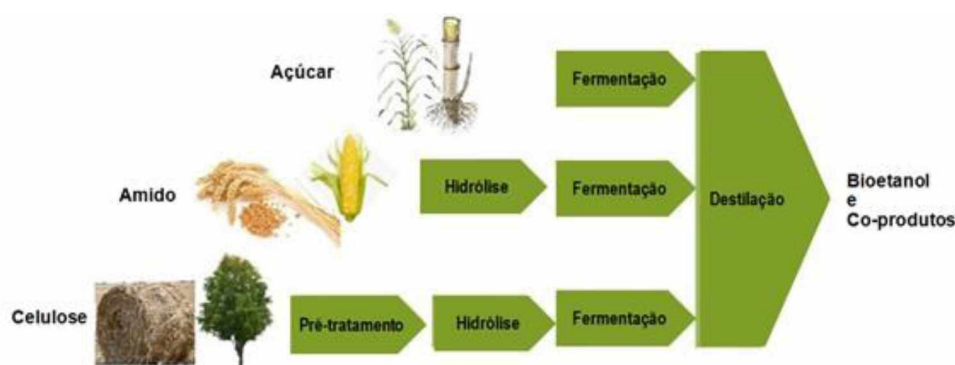


Figura 2 – Esquema da obtenção de bioetanol

### 2.2. A importância do bioetanol como combustível

A grande dependência do petróleo e a previsão da sua escassez tem levado a Comunidade Internacional e Europeia a desenvolver esforços para encontrar uma alternativa<sup>5</sup>. Por outro lado, o uso indiscriminado do petróleo e dos seus derivados nas últimas décadas provocou a atmosfera com emissões de poluentes que contribuem para o efeito de estufa, apresentando um impacto significativo na qualidade do meio ambiente<sup>6</sup>.

Na União Europeia os transportes públicos são responsáveis por cerca de 24% do total de emissões de gases com efeito de estufa para a atmosfera, sendo necessário encontrar soluções viáveis principalmente para este sector<sup>2</sup>.

A legislação Portuguesa relativamente à utilização de biocombustíveis tem vindo a mudar. O Decreto-Lei nº62/2006, referido anteriormente, visa a aplicar e aumentar a introdução de biocombustíveis em Portugal, estabelecendo algumas metas e normas. A principal razão para esta mudança é o facto de ser necessário reduzir as emissões de carbono, para dar continuidade ao tratado de Quioto, e assim reduzir o efeito de estufa provocado por estas emissões.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

Ao contrário do petróleo, o bioetanol como combustível não contribui para o acumular de gases de efeito de estufa na atmosfera<sup>5</sup>, daí ser uma das grandes alternativas ao combustível fóssil. A produção de bioetanol de 1ª geração, embora não seja drasticamente poluente, cria concorrência directa e indirectamente com a alimentação humana e animal, enquanto que o etanol de 2ª geração para além de não criar qualquer tipo de concorrência ainda apresenta uma solução para os resíduos agro-industriais e agro-florestais que teriam de ser eliminados, uma vez que já não apresenta qualquer uso, depois de retirado a polpa ou o bagaço, consoante a biomassa utilizada<sup>7</sup>.

Dadas as características químicas do etanol é possível uma combustão mais limpa, uma vez que não é utilizado o carbono não orgânico, e um melhor desempenho dos motores que utilizam este combustível<sup>7</sup>.

### **2.3. O bioetanol a nível mundial**

O mercado internacional de etanol tem sido estimulado pelos organismos governamentais com políticas de incentivo ao uso de combustíveis renováveis, para reduzirem as emissões de gases com efeito de estufa. O Brasil é o principal exportador, enquanto que os Estados Unidos e a Europa são os principais importadores<sup>8</sup>.

No Brasil, o uso do etanol como combustível é muito comum. O bioetanol utilizado no Brasil provém, directamente, da cana-de-açúcar. Na década de 80, mais de metade dos carros utilizavam etanol, no entanto a falta de açúcar e o seu preço elevado fez com que diminuísse a utilização deste biocombustível<sup>8</sup>.

Nos Estados Unidos, o etanol é utilizado de duas maneiras: misturado com gasolina na proporção máxima de 10, ou em misturas contendo 85% de etanol e 15% de gasolina. Na Índia, a adição de 5% de etanol à gasolina é obrigatória em 10 estados e 3 territórios. A Suécia também utiliza misturas contendo 5% de etanol na gasolina, no Canadá e algumas regiões da China utilizam misturas contendo 10% de etanol na gasolina. No Japão está autorizada a utilização de 3% de etanol na gasolina. A Tailândia promove a utilização de 10% de etanol e 90% de gasolina<sup>8</sup>.



## **2.4. Perspetiva económica**

De acordo com estimativas de produção de etanol a partir da celulose, os maiores componentes de custo de capital são para pré-tratamentos de matérias-primas e para a sacarificação e fermentação simultânea ou separada<sup>8</sup>. A evolução da Genencor Internacional e Novozymes Biotech resultaram em uma queda de até 30 vezes no custo das enzimas para o processo de hidrólise para produção de etanol.

## **2.5. Estrutura e composição dos materiais lenhocelulósicos**

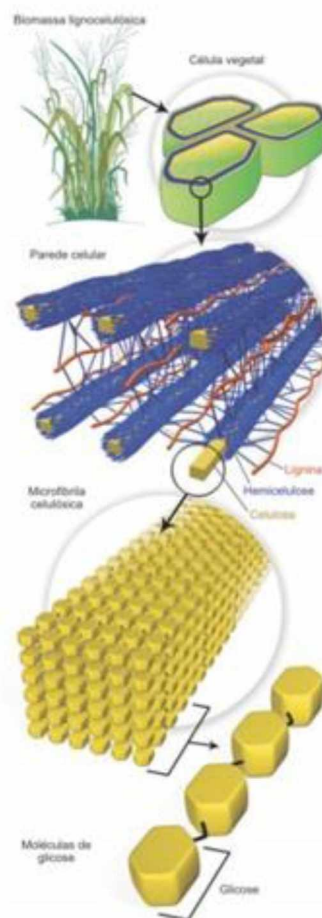
As biomassas lenhocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantes na Natureza, constituem mais de 60% da biomassa produzida mundialmente o que a torna atractiva para a produção de etanol<sup>4</sup>.

Estas biomassas são constituídas por três principais frações: lenhina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma complexa rede cuja função é resistir a ataques microbianos. As fibrilas da fração celulósica dispõem-se como espirais, conferindo força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lenhina, que aumenta a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira fração, a hemicelulose, atua como elo químico entre a celulose e a lenhina. Estas características resultam em materiais flexíveis e altamente resistentes a espécies químicas<sup>3</sup>. A figura 3 representa a estrutura recalcitrante da biomassa lenhocelulósica.

A celulose corresponde acerca de 30 a 60% de matéria seca total de matéria-prima, sendo o principal componente da biomassa vegetal. A sua estrutura é composta por duas unidades de glicose adjacente e são ligadas através da eliminação de uma molécula de H<sub>2</sub>O entre os grupos hidroxílicos no carbono 1 e no carbono 4<sup>9</sup>.

As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados e de menor massa molar que a celulose. A hemicelulose, está presente entre 20 a 25% nos materiais lenhocelulósicos, é composta por vários açúcares como a glicose, manose, galactose e xilose, embora em menor quantidade também estão presentes a arabinose e grupos acetila<sup>10</sup>. A estrutura ramificada da hemicelulose diminui as energias de ligações e também a cristalinidade, fazendo com que seja mais facilmente hidrolisada do que a celulose<sup>9</sup>.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol



**Figura 3 – Estrutura recalcitrante da biomassa lenhocelulósica**

A lenhina é polímero que possui uma estrutura polifenólica complexa<sup>9</sup>. Representa cerca de 20 a 30% do material lenhocelulósico seco<sup>10</sup>, é constituída por uma rede complexa de substâncias quimicamente semelhantes com diferentes pesos moleculares, sendo capaz de formar ligações covalentes com a hemicelulose tornando-se um componente com uma estrutura rígida<sup>5</sup> que pode ser separada dos açúcares<sup>9</sup>.

Os componentes que foram descritos estão ligados quimicamente formando a parede celular dos vegetais lenhocelulósicos<sup>11</sup>.

## 2.6. Produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica

Tal como foi mencionado no ponto 2.1., a longo prazo, o aumento da produção de bioetanol não se poderá apoiar apenas em matérias-primas como o amido e a sacarose, o etanol de primeira geração. Isto porque recentes estudos têm associado a produção de bioetanol ao aumento dos preços dos alimentos<sup>12</sup>. Por este motivo, há um interesse mais urgente no desenvolvimento de biocombustíveis a partir de biomassas que não sejam usadas como alimentos, que usem menos terras e água de forma intensiva ou a utilização de resíduos de agroindústrias, os biocombustíveis de segunda geração.

Na figura 4, podemos observar como é produzido o bioetanol a partir da biomassa lenhocelulósica de uma forma simplificada. O processo de fotossíntese realizado pelas plantas permite o armazenamento de energia, a partir da energia solar, na forma de polímeros na parede celular das plantas. As plantas podem ser vistas como sistemas colectores de energia solar e armazéns de energia termoquímica que posteriormente será disponibilizada através de processos termoquímicos e enzimáticos<sup>3</sup>.

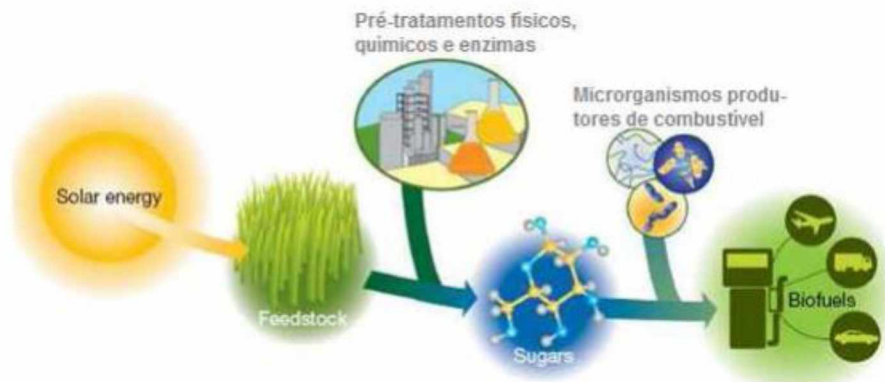


Figura 4- Esquema da bioconservação de energia solar em biocombustíveis (RUBIN, E; 2008)

O processo geral da produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos consiste em quatro processos que estão esquematizados na figura 5<sup>13</sup>.

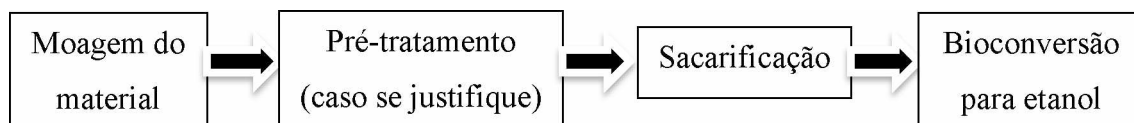


Figura 5 – Esquema dos processos para obtenção de bioetanol

### 2.6.1. *Pré-tratamentos em materiais lenhocelulósicos*

Os objectivos dos pré-tratamentos sobre o material lenhocelulósico é aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose se torne mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis, como se pode observar pela figura 56<sup>14</sup>. O pré-tratamento tem sido considerado o processo mais caro na conversão de biomassa em açúcar fermentável. Taherzadeh e Karimi propuseram uma “lista” de pré-requisitos para um pré-tratamento ideal com biomassas lenhocelulósicas, em que é referido que se deve evitar a destruição da hemicelulose e da celulose evitando a formação de possíveis inibidores de enzimas, reduzir o custo da redução de tamanho de matérias-primas assim como o custo do material para a construção dos equipamentos reduzindo assim o resíduos<sup>4</sup>.

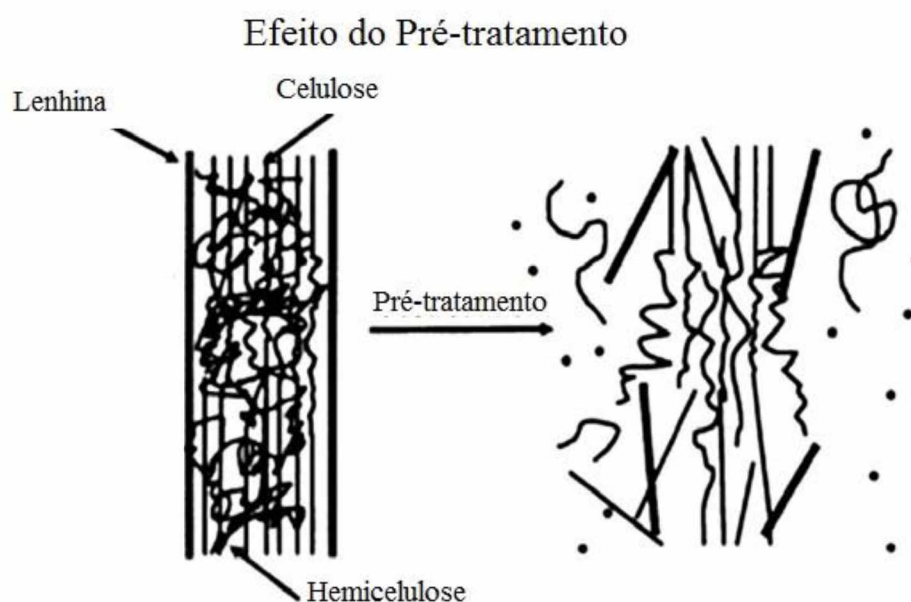


Figura 6 - Esquema do efeito dos pré-tratamentos na biomassa lenhocelulósica

Os tratamentos sem um pré-tratamento obtêm um rendimento  $<20\%$ , enquanto que depois de um pré-tratamento existe um sucesso muitas vezes superior a  $90\%$ <sup>4</sup>.

Os processos de pré-tratamento utilizados neste trabalho foram a hidrólise ácida e a radiação micro-ondas.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

Durante o processo de pré-tratamento, os açúcares que estão presentes podem ser transformados em outros compostos. Segue-se a figura 7 onde vem esquematizado os produtos de alguns pré-tratamentos.

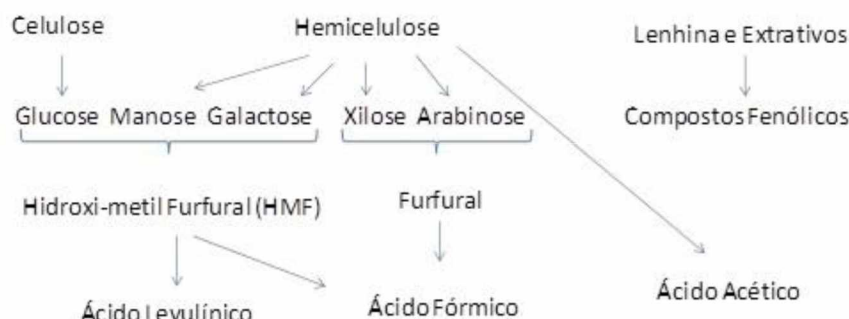


Figura 7 – Compostos de degradação dos diversos componentes da biomassa lenhocelulósica

### *Hidrólise ácida*

A hidrólise ácida é um dos métodos mais estudados no que diz respeito aos pré-tratamentos, sendo dos métodos com maior potencial para aplicação em larga escala<sup>15</sup>.

Neste tratamento são utilizados ácidos diluídos e altas temperaturas, com tempos de tratamento variáveis. A hidrólise em ácido iluído envolve condições de pressão e temperatura elevadas e tempos de exposição baixos, mas apenas atinge conversões de 50%. Já com altas concentrações de ácido, entre 40% e 70%, é necessário mais tempo e temperaturas moderadas, convertendo até 90%<sup>16</sup>.

Este pré-tratamento é utilizado para aumentar a acessibilidade para as enzimas de celulose mas também pode ser utilizado para uma sacarificação directa. O tratamento em meio ácido trabalha essencialmente na hemicelulose, hidrolisado-a para açúcares monoméricos. A lenhina não é removida de forma significativa, embora parte dela seja solubilizada<sup>10</sup>. O ácido mais utilizado é o ácido sulfúrico dado o seu baixo preço e aos poucos problemas com corrosão quando comparado com o ácido clorídrico<sup>17</sup>. O rendimento total de vários açúcares obtidos chega a 63% do peso do material lenhocelulósico quando é utilizado ácido sulfúrico, no entanto a concentração aconselhável não deve ser superior a 2%, enquanto que para um maior sucesso com o ácido clorídrico a concentração deverá ser bastante superior, entre os 25% e 80%<sup>18</sup>.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

A vantagem da hidrólise ácida diluída é o seu curto tempo de reacção, o que facilita o processo contínuo<sup>15</sup>, no entanto dado as condições drásticas formam-se compostos derivados da glicose, furfurais, que são inibidores microbiológicos de processos posteriores, nomeadamente a fermentação<sup>16</sup>.

### *Micro-ondas*

A radiação micro-ondas pode ser uma solução chave para um processo ambientalmente benigno para tornar a celulose contida nas biomassas lenhocelulósicas em açúcares redutores<sup>19</sup>.

O uso deste pré-tratamento para acelerar reacções orgânicas tem tido grande interesse uma vez que se trata de um processo com um rendimento elevado de açúcares redutores num tempo de reacção curto<sup>19</sup>.

Entre outras tecnologias, o processo de micro-ondas tem uma longa história no pré-tratamento. Foi introduzido em 1984 para pré-tratamento de madeiras e resinosas, mas não houve nenhum desenvolvimento na década de 1990 até recentemente. A maioria das investigações prendiam-se em melhorar a digestibilidade enzimática da biomassa<sup>20</sup>.

Os tratamentos comuns com micro-ondas utilizam temperaturas elevadas o que por vezes pode degradar componentes úteis da biomassa. No entanto, já foram efetuados alguns testes em micro-ondas com meio alcalino, meio ácido e meio com água. Estes tratamentos mostraram-se mais eficaz que tratamentos químicos simples uma vez que eliminou significativamente a hemicelulose e a lenhina, criando hidrolisados ricos em glicose e mais pobre em xilose<sup>19</sup>.

Como referido anteriormente, outros processos que transformam a celulose em açúcares redutores incluem a hidrólise enzimática e a hidrólise ácia diluída, mas nenhum destes métodos apresenta benefício em termos de custos<sup>19</sup>.

Alguns ensaios de pré-tratamento já foram realizados com micro-ondas em meio alcalino, utilizando NaOH, e em condições óptimas. A análise da composição comprovou que a utilização do micro-ondas é um método de aquecimento eficiente no pré-tratamento da palha de arroz. A remoção da lenhina e da hemicelulos, embora não tenha sido recuperada significativamente, foi superior no pré-tratamento assistido com

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

NaOH, cerca de 54,55%, do que nas amostras em branco, 52,2%<sup>21</sup>. Noutro trabalho realizado concluiu-se que a aplicação do micro-ondas pode diminuir o tempo de sacarificação e de fermentação simultanea, podendo assim reduzir significativamente o custo de produção de etanol<sup>16</sup>.

Na tabela 2.1 estão representadas algumas vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos descritos acima.

**Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens dos processos de pré-tratamento: Hidrólise ácida e radiação micro-ondas**<sup>19,21-24</sup>

	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Hidrólise ácida</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo consumo de ácido;</li> <li>• Curto tempo e reação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo rendimento de hidrólise;</li> <li>• Formação de inibidores da fermentação.</li> </ul>
<b>Radiação micro-ondas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Economia de tempo e energia;</li> <li>• Operação fácil e ambientalmente amigável;</li> <li>• Utilização de catalisadores mais disponíveis e baixo custo;</li> <li>• Atinge simultaneamente o efeito de ativação e de aceleração a hidrólise</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo rendimento;</li> <li>• Formação de compostos de baixo peso molecular</li> </ul>

### 2.6.2. Sacarificação

A sacarificação é um tratamento que não obtem sucesso sozinho, ou seja é necessário primeiramente um pré-tratamento uma vez que a lenhocelulose é resistente ao ataque



enzimático. Depois de já estarem disponíveis os açúcares simples já se pode realizar a sacarificação. A sacarificação é o tratamento que encarece toda a conversão da biomassa a etanol uma vez são necessárias enzimas dispendiosas<sup>18</sup>.

As enzimas são proteínas naturais que catalisam determinadas reacções químicas. A sacarificação é um processo lento uma vez que a hidrólise da celulose é prejudicada pelos parâmetros estruturais do substrato, como a lenhina e hemicelulose, a área de superfície e a cristalinidade da celulose<sup>15</sup>

Esta técnica está muito dependente do pré-tratamento e da composição da biomassa utilizada, um pré-tratamento pobre em composição pode ser compensado utilizando uma carga maior de enzimas na sacarificação, assim como num pré-tratamento mais rico as quantidades de enzimas necessárias são menores. Assim é importante encontrar uma condição ideal que irá minimizar o custo das etapas anteriores<sup>15</sup>.

Os principais organismos produtores do complexo celulase são os fungos *Trichoderma sp* e *Aspergillus sp*. os fungos têm sido bastante estudados dada a variedade de enzimas que produzem<sup>25</sup>.

As enzimas utilizadas no trabalho foram:

**Novozyme 188** – “Preparação enzimática de celobiase obtida por fermentação de um microrganismo *Aspergillus niger*. A celobiase hidrolisa a celobiose em glucose;”

**Celluclast 1.5L** – “Produzida por fermentação de uma estirpe selecionada do fungo *Trichoderma reesei*, que catalisa a quebra da celulose em glucose, celobiose e polímeros superiores de glucose.”

## 2.7. O Figo-da-índia como biomassa

A taxonomia do género *Opuntia* por parte dos autores é difícil pois os fenótipos e variedades desta espécie variam muito consoante as condições ecológicas e a existência de numerosos híbridos<sup>26</sup>. Esta planta pertence ao Reino *Plantae*, Classe *Dicotyledonea*, Subclasse *Dialipetalas*, Ordem *Caryophyllales*, Família *Cactaceae*, Género *Opuntia*. O seu nome científico foi atribuído por Tourneford em 1700, devido à semelhança com uma planta espinhosa que crescia numa cidade da Grécia, *Opus*<sup>27</sup>. É um cato arbustivo



## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

constituído por raiz, caule (cladódios), flores e frutos (doces e suculentos)<sup>28</sup>. O aspecto da planta stá representado na figura 8.



Figura 8 – Fotografia da espécie *Opuntia ficus indica*

A maioria das plantas da espécie *OFI* possui os seus cladódios envoltos em espinhos, no entanto existem plantas que não os possuem. Esta presença ou ausência de espinhos é uma característica utilizada com frequência na identificação dos ecotipos desta planta<sup>27</sup>. Os espinhos podem atingir alguns centímetros de comprimento e são constiuídos por um conjunto de fibras celulósicas, compostas por microfibrilas, dispostas de forma compacta.

*Opuntia ficus indica*, planta originária da América, é conhecida por ser uma fonte importante de compostos bioativos, como betaláinas, polifenóis, carotenóides, vitamina c e sais minerais, e tem sido considerada como uma planta a usar na prevenção de algumas doenças<sup>27</sup>.

É popularmente designada por figueira-da-índia, nopalera, tuna, figuera de mor, indiapico, tabaibeira, figueira-do-diabo, figueira-do-inferno, palma forrageira, cacto dos figos da índia, entre outros<sup>28</sup>. Pode ser consumido como legume fresco, adicionado a cozidos, cozido ou usado em saladas.

A espécie *OFI* é cultivada em todos os continentes excepto na Antártida. Tem crescido a nível comercial como uma cultura frutícola em que mais de 100 000 ha estão distribuídos principalmente pelo México, Chile, Itália, África do Sul, África do Norte e EUA<sup>26</sup>.

Esta cultura desenvolve-se principalmente em regiões semiáridas, para preservação do solo, produção de frutos e verduras para o consumo humano, ração para animais, biomassa para fins energéticos e outros produtos como remédios e cosméticos<sup>29</sup>. É uma

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

espécie que suporta a falta de água, temperaturas mais elevadas e solos pobres, daí ter havido um crescimento da sua plantação na região do Alentejo nos últimos anos.

As sementes contêm xilano, que é caracterizado por um elevado teor de ácido glucorónico<sup>30</sup>. Estas contêm 16,6% de proteínas, 17,2% de gordura e 49,6% de fibra. Em termos nutricionais a quantidade de Mg, P, K, Zn e Cu é bastante significativa pois contribui aproximadamente com 10-20% da dose diária recomendada para um adulto. Um estudo à composição aminoácida da semente do figo da índia indica que metade do teor de aminoácido da proteína é ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina e glicina<sup>30</sup>.

Um estudo relativamente à caracterização da casca do *OFI* indica que a quantidade de casca é de 40% do seu peso (com base no peso húmido), e foram medidas importantes quantidades de gorduras, cerca de 11%, bem como de sais minerais, com 11,5%, já o teor de lenhina foi mais baixo de 2,4% do peso. Os principais constituintes da casca eram polissacarídeos, 66,1% em peso, incluindo 27% em peso de celulose<sup>30</sup>.

Comparando a composição das diferentes partes da *OFI*, efetuada num estudo, podemos afirmar que a semente é rica, essencialmente, em proteína e fibras totais, enquanto que a casca contém mais cinza e amido, já a polpa é composta por etanol. As fibras são compostas essencialmente por Hemicelulose, celulose, pectina e lignina, em que a hemicelulose está principalmente presente na casca, a celulose e a lignina na semente e a pectina na polpa<sup>30</sup>.

A escolha desta planta para este estudo deve-se essencialmente ao facto da plantação do figo-da-índia ter aumentado nos últimos anos para produção de sumos, polpas e compotas. Com este aumento também aumentaram os resíduos destas produções, como a semente e a casca, pelo que é importante conseguir reutilizar os resíduos resultantes da utilização do *OFI*.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Caracterização

##### 3.1.1. Determinação dos sólidos totais na biomassa

O objectivo deste procedimento é calcular os sólidos totais da nossa amostra. Foi colocada cerca de 1g em dois cadinhos, previamente tarados a 105°C, e foi registado o seu peso. Colocou-se na estufa a 105°C±3°C durante a noite. Depois de se retirar da estufa colocou-se a arrefecer no exsiccador e registou-se novamente o peso. E fez-se então o cálculo com base na seguinte equação:

$$\% \text{ Sólidos Totais} = \frac{(Wf - Wc)}{Wa} \times 100$$

Em que: Wf – Peso total seco (g); Wc – Tara do cadinho (g); Wa – Peso da amostra (g).

##### 3.1.2. Determinação das cinzas na biomassa

Este procedimento é utilizado para quantificar a percentagem de cinzas da biomassa em relação ao seu peso seco, isto porque o material inorgânico também faz parte da estrutura da nossa biomassa e portanto é necessário quantificá-la.

Para este procedimento também é necessário que os cadinhos estejam tarados, colocando na mufla a 575±25°C durante a noite e registando o seu peso depois de arrefecidos no exsiccador.

Depois de seca na estufa e armazenada no exsiccador, para não haver contaminação ou variação da humidade, foi levada à mufla 1g de biomassa no cadinho com uma réplica. Foi registado o seu peso antes de ir à mufla. Programou-se para 575°C durante 5h. Depois das 5h deixou-se arrefecer os cadinhos no exsiccador e sensivelmente 1h depois foi pesado e registado o peso. O cálculo das cinzas foi feito a partir da equação:

$$\% \text{Cinzas} = \frac{\text{Massa}_{cad.+cinzas} - \text{Massa}_{cad.}}{\text{Amostra}_{seca}} \times 100$$

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

Tanto o procedimento para a determinação das cinzas como o dos sólidos totais foram baseados no procedimento proposto pelo NREL<sup>31</sup>.

### **3.1.3. Determinação dos extrativos na biomassa**

O objectivo deste procedimento é contabilizar os extratáveis em água e etanol da biomassa.

Este procedimento foi efetuado depois de se ter conhecimento da humidade da amostra, seguindo o procedimento na alínea 3.1.1.

Pesaram-se os dedais antes de colocar a amostra, colocou-se a amostra nos dedais e pesou-se novamente para obtermos o peso da amostra utilizada no ensaio, de seguida topou-se com algodão. Colocaram-se os dedais no soxhlet.

Numa primeira fase fez-se a extração com água, colocando 250 mL de água destilada num balão de fundo redondo de 500 mL. Esta extração realizou-se por um período de 25h não contínuas. A duração do ensaio foi baseada na coloração obtida junto do dedal, assim que se mostrou mais transparente deu-se por concluída a mesma. Quando terminou a extração com água foi retirada uma amostra de 10 mL do licor para ser analisado por HPLC. A restante fase líquida colocou-se em goblés tarados e colocou-se a secar a 105°C, para ser obtido o peso seco dos extratáveis em água.

Seguidamente seguiu-se para a extração com etanol, bastando substituir os balões anteriores por balões com 190mL de etanol. Os ciclos do etanol foram mais rápidos não se podendo comparar a partir da cor o final do ensaio. Uma vez que não houve tanta percepção pela cor da água a extração teve uma duração de 27h. Quando se terminou o ensaio voltou a retirar-se 10mL de amostra para analisar e o restante foi evaporado no rotavapor, para se reaproveitar o etanol, e de seguida colocado na estufa a 105°C.

Uma vez que se retirou 10mL para analisar no HPLC em ambos os ensaios, utilizou-se a fórmula recomendada pelo NREL<sup>32</sup> com a correção do licor retirado.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

$$\% \text{ Extratáveis} = \frac{\text{Peso seco}_{\text{frasco+extrativos}} - \text{Peso}_{\text{frasco}}}{\text{Amostra}_{\text{seca}}} \times \frac{\text{Volume}_{\text{total}}}{\text{Volume}_{\text{total}} - \text{Volume}_{\text{retirado}}} \times 100$$

### 3.1.4. Determinação da proteína bruta e do azoto

A proteína total foi calculada de acordo com o método de Kjeldahl. Foi utilizada uma massa de 0,5g de amostra à qual foi adicionada 10g de mistura catalisadora ( para 100g juntar 3g de sulfato de cobre, 3g de óxido titânio, 1g de ácido esteárico e 93g de sulfato de potássio) e 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 96% e colocaram-se os tubos com as amostras preparadas na unidade de aquecimento do aparelho de digestão como podemos ver na figura 4. Depois foi colocado o sistema de extração de fumos e deixou-se a fazer a digestão por 2h.

Depois de terminada a digestão e após o arrefecimento adicionou-se 100 ml de água destilada e 50 mL de ácido bórico 4% (p/v) aos tubos com a amostra e aos brancos.

De seguida colocaram-se os tubos no aparelho de destilação, idêntico ao da figura 5. Durante este procedimento foi libertado amoníaco por adição de NaOH, que é arrastado por uma corrente de vapor de água sendo depois recolhido na solução de ácido bórico. Depois deste processo o amoníaco foi doseado por titulação com HCl 0,1N, na presença de solução indicadora de pH que se torna violeta a pH 4,8. Para os ensaios em branco procedeu-se da mesma maneira substituindo a massa da amostra por água destilada.

Para o cálculo do teor de azoto da amostra foi utilizada a equação:

$$\% \text{Azoto}_{\text{total}} = 0,0014 \times (\text{Vol}_{\text{gasto na titulação}} - \text{Vol}_{\text{Titulação branco}}) \times \frac{100}{\text{Massa}_{\text{amostra}}}$$

E para o cálculo da proteína bruta utilizou-se a equação de acordo com o procedimento indicado no <sup>33</sup>:

$$\text{Proteína bruta} = 6,25 \times \% \text{Azoto}$$

### ***3.1.5. Cálculo da percentagem e sólidos insolúveis em ácido e da lenhina de Klason***

Este ensaio teve como objectivo solubilizar todos os açúcares estruturais em monossacáridos que possam ser quantificados para se poder caracterizar quantitativamente a nossa amostra.

Para a caracterização da biomassa, segundo o NREL<sup>34</sup>, foi pesada  $0,3000\text{g} \pm 0,1000\text{g}$  de biomassa para um tubo de ensaio, com uma réplica, adicionou-se 3mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 72%, homogeneizou-se com varetas e deixou no banho a  $30^\circ\text{C}$  por 1h, agitando de 10 em 10 minutos. Quando se retirou do banho, adicionou-se 84 mL de água destilada para termos uma solução a 4% em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Passou-se para frascos Schotts estanques à perda de voláteis e colocou-s na autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 1h. Juntamente com as amostras foram também alguns açúcares à autoclave, manose, glucose, xilose, galactose e arabinose, para termos conhecimento da quantidade degradada de cada açúcar durante a hidrólise e assim ser feita a correção na amostra.

Depois da autoclave arrefecer até aos  $70^\circ\text{C}$ , retiraram-se as amostras e os açúcares e colocou-se em água fria. Assim que arrefeceram retirou-se 1,5mL do sobrenadante para analisar no HPLC com a coluna aminex. Recolheu-se esta amostra imediatamente da abertura dos frascos para não se perderem os compostos voláteis, como o ácido acético.

Depois o hidrolisado foi filtrado para cadinhos filtrantes tarados, ficando com a fracção sólida e fracção líquida. Os cadinhos filtrantes seguiram para a estufa a  $105^\circ\text{C}$  para obter o peso seco e de seguida para a mufla a  $575^\circ\text{C}$  para calcular as cinzas para obter a quantidade de lenhina de Klason pela diferença entre o peso seco e as cinzas. A fracção líquida foi também analisada pela coluna REZEX depois de se acertar o pH a 4-5, como é aconselhado no protocolo do NREL<sup>34</sup>.

## **3.2. Análise de açúcares, ácidos orgânicos e etanol**

### ***3.2.1. Análise por DNS***

Este método utiliza a característica redutora de açúcares para a sua quantificação. A molécula Ácido 3,5- dinitro salicílico (DNS) quando puro apresenta uma cor alaranjada.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

O ácido é facilmente reduzido por açúcares. “Quando reduzido, o DNS torna-se ácido 3-amino – 5 – nitro salicílico, e passa a apresentar-se com uma coloração acastanhada.”<sup>35</sup>

O reagente DNS foi preparado dissolvendo 10g de ácido 3,5 – dinitrosalicílico em 500 mL de água destilada, de seguida adicionou-se 200 mL de NaOH 2M e 300g de tartarato de sódio e potássio. Adicionaram-se mais 700 mL de água destilada.

A solução DNS foi guardada à temperatura ambiente para ser utilizada sempre que necessário.

A concentração de glúcidos redutores foi determinada colocando em tubos de ensaio 0,5 mL de amostra, 1,0 mL de tampão citrato, adicionando-se de seguida 3 mL de reagente DNS. Os tubos foram colocados em banho de água a ferver durante 5 minutos e de seguida foram colocados em banho de água gelada para parar a reação. Adicionaram-se 15 mL de água destilada e após 20 minutos de repouso, as absorvâncias foram lidas a 540nm no espectrofotómetro Hellö, da Thermo Scientific. Para a construção da curva de calibração usou-se a glucose como padrão.

### 3.2.2. *Análise por HPLC*

A determinação das concentrações de glucose, frutose, celobiose, xilose, etanol, ácidos orgânicos e compostos furânicos são feitas utilizando a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). As corridas cromatográficas foram efetuadas utilizando um equipamento *La Chrome Merck Hitachi* com um software D HSM-7000 e com um módulo de interface L7000, um amostrador automático L7200, um detetor de índice de refração (RI) L7490, e um detetor de UV-Vis L-7420, forno de coluna L7350 e uma bomba quaternária L7100.

Foi utilizada a coluna de troca iónica Aminex HP- 87H (7,8 mm x 300 mm) da Bio-Rad (E.U.A.) a 50 °C com um fluxo de 0.6 mL/min, com um volume de injeção de 5µL, para a análise das amostras de sacarificação e fermentação. Para a análise quantitativa foi utilizado o fluxo de 0.4 mL/min e um volume de injeção de 20 µL. Foi utilizada uma solução 5.0 mM de ácido sulfúrico como fase móvel. Para o *5-hidroxi-metilfurfural* (Hemi Furfural) e furfural foi usado o detector de UV regulado para 280 nm, e para os restantes compostos o detector de RI. As amostras e eluentes foram pré-filtrados com filtros *Pall* com um tamanho do poro de 0.45µm ou de 20 µm. O valor de cada um dos

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

açúcares e etanol analisados foi obtido tendo em conta a área obtida nos cromatogramas que foram convertidos em concentração a partir de curvas de calibração dos respetivos padrões.

Na coluna Rezex RPM-monosaccharide Pb<sup>+</sup> (300 x 7,8 mm) a fase móvel utilizada foi água ultrapura a pH 7, fluxo isocrático de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura do forno 80°C. Para as injeções foram utilizados 20 µL das soluções padrões e amostras.

A coluna Aminex HP-87H foi utilizada para analisar as amostras tanto da caracterização como dos restantes tratamentos, enquanto que a coluna Rezex RPM-monosaccharide foi apenas utilizada na caracterização.

Na tabela 3.1 está resumido as características utilizadas em cada coluna.

Tabela 3.1 – Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC

Designação/Coluna	HPX -87H (Aminex)	RPM – Monosaccharid (Rezex)
Fase móvel	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5,0 mM	H <sub>2</sub> O ultrapura
Caudal	0,4 mL/min (caracterização)	0,6 mL/min
	0,6 mL/min (restantes casos)	
Temperatura da coluna	50°C	80°C
Comprimento de onda UV	280 nm	-
Volume de amostra	20 µL (0,4 mL/min) ou	20 µL
	5 µL (0,6 mL/min)	

### 3.3. Pré-tratamentos

#### 3.3.1. Micro-ondas

Para os ensaios feitos em micro-ondas não foi seguido um procedimento existente, uma vez que não há muitos testes nestas condições, pelo que o procedimento que foi feito foi adaptado de outros trabalhos com outras biomassas<sup>19,20</sup>.



## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

A utilização da radiação micro-ondas como pré-tratamento é uma inovação do CEBAL, daí ter sido necessário realizar testes preliminares para testar o efeito desta radiação na biomassa.

### *3.3.1.1. Ensaaios preliminares*

O estudo preliminar foi feito com 3 tipos de soluções: água, solução ácida (2%) e solução básica (2%). A água, solução ácida ou solução básica foi efectuada sobre a semente, a casca sem extrativos e sobre a casca húmida com extrativos. Pesaram-se as biomassas para frascos schotts, de modo a que o peso seco utilizado fosse 0,5g, de seguida adicionou-se a água respetiva para cada ensaio para perfazer um peso total de 10g para todos os ensaios de forma a ficarmos sempre com uma carga de biomassa de 5% em peso seco. Foi contabilizada a humidade de cada uma das amostras nos cálculos para a adição da água. Nos ensaios com ácido utilizou-se o ácido sulfúrico concentrado (96% p/p). Foi utilizado um procedimento idêntico ao anterior e a quantidade de base adicionada foi 2g da solução de NaOH preparada. À medida que se foram adicionando os solventes foram-se agitando os frascos para não haver um “choque”. Para cada ensaio com as diferentes amostras foram feitas 4 réplicas, Duas réplicas foram usadas para os ensaios com o micro-ondas e as outras duas ficaram apenas a repousar com a biomassa em estudo. Estas duas últimas réplicas serviram de controlo. Assim, ficamos com duas réplicas com o efeito do micro-ondas e duas réplicas sem micro-ondas.

O equipamento utilizado foi um micro-ondas doméstico, marca Bekoo MW com capacidade de 20L. A potência utilizada foi de 119W durante 5 minutos. Deixou-se arrefecer e de seguida despejou-se o conteúdo para falcons de 15ml para centrifugar a 11 000 rpm, de modo a separar o licor do sólido. Todos os ensaios, com micro-ondas e sem micro-ondas foram colocados na centrifuga. Por fim, filtrou-se cerca de 1 mL de cada licor obtido para serem analisados por HPLC.

### *3.3.1.2. Ensaaios com ácido a 4%*

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

Para o ensaio com ácido a 4% foram utilizadas quantidades diferentes de biomassa. Os ensaios foram feitos de forma a termos uma Razão Líquido Sólido (RLS) de 10% (p/v) de semente. Foram feitos ensaios com 12,5g, 25g e 50g de peso seco de semente de figo da Índia e os volumes de 125mL, 250mL e 500mL respectivamente, de ácido sulfúrico a 4% (p/p). Também aqui foi contabilizada a humidade da amostra. O procedimento foi igual ao descrito no ponto 4.2.1. mas em vez de schotts foram utilizados copos de precipitação de 500 mL tapados com vidro de relógio. Foram testadas diferentes condições de tratamento com o micro-ondas. Diferentes potências: Potência Média (385W) (PM), potência média alta (539W) (PMA) e potência alta (700W) (PA) durante 5 e 10 minutos.

Depois de arrefecer, a amostra foi centrifugada para se obter os licores e os sólidos tratados. O licor foi filtrado e analisado no HPLC e a biomassa congelou-se -20°C para posterior utilização nos ensaios de sacarificação.

### 3.3.2. *Hidrólise ácida diluída*

Foram feitos ensaios com hidrólise ácida uma vez que este é o método mais utilizado em grande escala. Era importante termos estes valores para podermos comparar com os ensaios feitos com micro-ondas para se ter mais preceção de qual será a mais vantajosa.

Neste estudo foi utilizado uma RLS de 10% da biomassa a testar. A concentração de ácido testada foi de 3.37 sendo o ácido o sulfúrico. O protocolo utilizado foi muito semelhante ou descrito no protocolo do NREL sobre hidrólise ácida diluída (por referência).

Inicialmente retirou-se o peso dos frascos schotts que foram utilizados e anotou-se. Pesaram-se 10g de semente, nos ensaios com a semente, para um volume final ácido de 50 ml de ácido; e 12g de casca, nos ensaios com a casca (tal qual e lavada), para um volume de 60 mL de ácido. Anotou-se o peso final e colocaram-se os frascos dentro da autoclave a 121°C durante 60 minutos. Depois desligou-se a autoclave e arejou-se até a temperatura estar aos 80°C. Findo este tempo abriu-se e retirou-se a amostra e colocaram-se os frascos em água fria para arrefecerem rapidamente até atingir a temperatura ambiente. Depois de arrefecer anotou-se o peso. Devido aos vapores

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

libertados, os frascos apenas foram abertos no interior da hotte. Antes da filtração, foi anotado o peso de todo o material que iria ser utilizado na filtração (funil de Buckner com o papel de filtro humedecido). Logo após a abertura do frasco retirou-se uma amostra para se filtrar e analisar no HPLC. De seguida filtrou-se a restante amostra com a ajuda da bomba de vácuo, separando a fase líquida da sólida. Foi pesado o material juntamente com a fase sólida para se ter conhecimento do peso da fase sólida. A fracção líquida foi congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise, a fase sólida foi lavada com água destilada. No final foi colocado 1g da fracção líquida a  $105^{\circ}\text{C}$  durante a noite, com o objectivo de se medir os sólidos totais da fase líquida. Também foram medidos os sólidos totais da fracção sólida para calcular a percentagem de sólidos recuperados.

### **3.4. Sacarificação enzimática**

A hidrólise enzimática é importante para tornar os açúcares mais fermentescíveis, ou seja tornar os polímeros em monómeros como a celulose em glicose e assim podermos usar como fonte de açúcar nas fermentações. Para este procedimento são utilizadas enzimas como tal, é necessário conhecer a sua atividade, estes procedimentos vêm descritos nos pontos a seguir.

#### **3.4.1. *Cálculo da actividade enzimática sobre papel de filtro***

Segundo Ghost, 1987, este procedimento foi concebido para medir a actividade da celulase. A actividade da enzima deve ser obtido utilizando várias diluições da enzima, em que é necessário uma diluição que produza uma quantidade de 2mg de glúcidos redutores formados durante 1h de incubação.

O conhecimento da actividade da enzima é importante pois permite por um lado saber como está a enzima a usar e por outro, permite-nos calcular o volume da enzima necessária a utilizar nos ensaios, quando se pretende usar determinada actividade durante a hidrólise enzimática.

Para o cálculo da actividade da enzima foi utilizado tiras de papel papel de filtro whatman nº1 para todos os ensaios, foi adicionado tampão citrato a 0,05M com pH a 4,8. Utilizou-se 0,5mL de enzima diluída em tampão citrato e deixou-se a incubar por 60min a  $50^{\circ}\text{C}$ . De seguida colocou-se em gelo e adicionou-se 3 mL de DNS para parar a

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

reacção. Foi necessário fazer o controlo de enzima e o branco de espectro para uma medição mais exacta. Para o desenvolvimento da cor uma vez que colocamos o DNS devemos ferver por 5min, transferir para um banho de água fria, diluir com água e deixar assentar. De seguida o ensaio deve estar com o aspecto como vemos na figura 7. E de seguida podemos medir a absorvância a 540 nm, no espectofotómetro Heλλos, da Thermo Scientific.

A actividade foi então calculada a partir da equação:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{Enzima que liberta 2mg glucose}} \text{ (units mL}^{-1}\text{)}$$

### 3.4.2. *Determinação da actividade celobiase*

Para este procedimento a análise já é feita através do HPLC.

Neste ensaio também foram feitas várias diluições da enzima. Colocou-se em tubos de ensaio, 1,0 mL de carboximetilcelulose diluída em tampão citrato 0,05 M com pH 4,8. Adicionou-se 1,0 mL de enzimas. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C durante 30 min e de seguida colocadas em gelo. No final ferveu-se durante 5 minutos. Centrifugou-se e filtrou-se para colocar no HPLC a analisar. Neste procedimento também são feitos os brancos de enzima e branco de substrato.

A actividade CMC foi obtida através da fórmula:

$$\text{CMC} = \frac{0,185}{\text{enzima que liberta 0,5 mg glucose}} \text{ (units mL}^{-1}\text{)}$$

### 3.4.3. *Ensaio de hidrólise enzimática*

Para os ensaios de hidrólise enzimática Foi utilizada 5% (p/v) de biomassa em peso seco, colocou-se 1mL de azida de sódio a 1% para evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis. De seguida juntou-se 0,5 mL de tampão citrato 20 vezes concentrado e a água necessária para se ter os 5% de sólidos. Para isso foi contabilizado a humidade da amostra de modo a que o volume final fosse 10 mL. Antes da adição das enzimas acertou-se o pH a 4,8 com NaOH a 2M. Por fim colocou-se a quantidade que foi calculada de enzima. As amostras foram depois

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

colocadas no agitador orbital por 72h a 50°C. Foram feitos igualmente os brancos de substrato e branco de enzima. A quantificação de glucose obtidas foi feita ao fim das 72h para isso retirou-se do agitador e colocou-se a ferver por 5 minutos em banho-maria. De seguida colocou-se em banho frio, filtrou-se e analisou-se no HPLC.

Para os cálculos foram utilizadas as equações segundo NREL<sup>36</sup>.

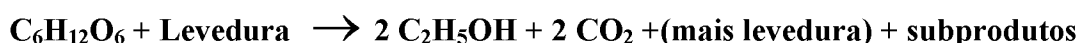
### 3.5. Fermentação

Neste trabalho foram feitos dois tipos de fermentação. Foi feita a fermentação após a sacarificação enzimática.

Para os ensaios de fermentação utilizou-se o meio resultante da hidrólise enzimática.

Preparou-se o inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1119) na noite anterior usando o meio YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e glucose 40 g/L) durante 15h a 30°C com agitação. Depois das 72h de sacarificação enzimática, foi adicionado a cada Erlenmeyer extrato de levedura e peptona estéril de forma a ter-se uma concentração de 2 e 1%, respetivamente. De seguida adicionou-se 5 mL de inóculo *S. cerevisiae* (NCYC-1119). Todos os Erlenmeyers foram incubados a 30°C durante 24 horas. Todos os ensaios fizeram-se em duplicados. Ao longo do tempo de ensaio, recolheram-se amostras que foram centrifugadas a 11000 rpm a 5°C durante 10 minutos. Sendo posteriormente filtradas por um filtro de 0,20 µm para análise por HPLC para a determinação dos açúcares presentes e etanol produzido..

A eficiência da fermentação foi calculada com base na conversão dos açúcares em etanol. Por cada grama de glucose é produzido 0,51 g de etanol de acordo com a estequiometria de conversão de glucose em etanol.



A equação utilizada para o cálculo foi:

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

$$\text{Eficiência da fermentação} = \frac{(EtOH_t - EtOH_0)}{[(Glc_t - Glc_0) + (Frut_t - Frut_0)] \times 0.51} \times 100$$

Onde :  $EtOH_t$  e  $EtOH_0$  corresponde à concentração de etanol no tempo 24 e 0 h, respectivamente.  $Glc_t$ ,  $Cel_t$  and  $Glc_0$ ,  $Cel_0$  correspondem à concentração de glucose e celobiose ao fim de 24 e 0h, respectivamente.

## 5. Resultados e discussão

Uma vez que foram utilizadas dois tipos de resíduos proveniente da produção do sumo/polpa do figo da Índia, a semente depois de extraída o óleo e a casca, optou-se por dividir os resultados para cada um dos resíduos. A primeira parte refere-se aos resultados obtidos com a semente e a segunda com a casca.

### 5.1. Semente

#### 5.1.1. Caracterização

A semente do OFI que recebemos, resultou de um processo de extração de óleo para a venda a indústria de produtos de cosmética e outros. A humidade da amostra recebida foi inferior a 10% pelo que não foi necessário secar. Por esse motivo foi apenas necessário reduzir o tamanho das partículas com um almofariz. O aspecto inicial pode ser visualizado na figura 9a). Depois de reduzir o tamanho com o almofariz, foi necessário utilizar o moinho de facas para reduzir e tornar mais homogênea a nossa amostra. Seguidamente separou-se a fracção maior da fracção menor ou igual a 1mm com a ajuda de um peneiro, em aço inox de 18 mesh, o aspecto da amostra de sementes pode ser visualizado na figura 9c).



Figura 9 – a) Semente recebida; b) Semente durante o processo de moagem; c) Semente moída e peneirada (tamanho  $\leq 1\text{mm}$ )

Depois de preparar a biomassa foi então calculado o teor de humidade. Os resultados são apresentados na Tabela 4.1. O teor de humidade da semente foi de 6,05% tal como já tinha sido mencionado, pelo que não foi necessário secar a biomassa para a sua posterior caracterização segundo o procedimento para a percentagem de sólidos totais proposto pelo NREL<sup>37</sup>, foi também calculada a percentagem de cinzas e proteínas

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

segundo os procedimentos indicados na seção 3.1.1. e 3.1.2., os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.1.

Na figura 10 está uma foto do processo de extração com água. Pode-se observar o aspecto da cor dos extratados, em que o número 1 e 2 correspondem à semente.



Figura 10 – Aparelho de soxhlet em série durante o ensaio de quantificação dos extrativos

Na extração com etanol criou-se uma espécie de gelatina chegando a impedir o ciclo do sifão, isto pode ter ocorrido devido ao aquecimento e posterior arrefecimento das pectinas, houve uma maior incidência nas amostras com semente. O ensaio com etanol teve uma duração de aproximadamente 27h. Analisando a tabela 4.1. observa-se que cerca de 10% da composição da semente são extratáveis em água e etanol, em que a percentagem de açúcares solúveis em água foi semelhante à percentagem de açúcares solúveis em etanol, 5,36% e 4,86% respectivamente.

Nos extratos aquosos da semente do figo da índia foi detetado 0,5g/L tanto para a glucose como para a frutose.

A biomassa resultante que ficou no dedal foi guardada para posterior caracterização dos polímeros de celulose, hemicelulose e lenhina. Após a extração com água e etanol foram feitas duas caracterizações de acordo com o procedimento indica no capítulo 3.2. Estas duas caracterizações vêm sumarizadas na tabela 5.1.



Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

Tabela 5.1 – Teores de humidade, cinzas, extratáveis em água, extratáveis em etanol, proteína bruta e de azoto total presentes na semente (em percentagem)

Componente	Quantidade em %
Humidade	6,05±0,18
Cinzas	2,09±0,12
Extratáveis em água	5,36±0,03
Extratáveis em etanol	4,86±0,29
Proteína bruta	10,04±0,05

Tendo em conta os resultados obtidos por *W.N. Sawaya Et. Al.*<sup>38</sup> a semente recebida no Cebal contém menor teor de proteína e cinzas comparando com os 16,6% e 3,0% mencionados neste artigo. Isto pode dever-se a vários fatores como o solo e o clima onde se desenvolveram os figos-da-índia utilizados em ambos os trabalhos.

Para o conhecimento da composição estrutural da semente foi realizada a hidrólise ácida quantitativa da biomassa sem os extrativos. A composição da semente vem resumida na tabela 5.2.

Tabela.5.2 – Caracterização da semente livre de extrativos (g/L)

Composto	Quantidade ( % )	
	1ª caracterização <sup>a</sup>	2ª caracterização <sup>b</sup>
<b>Glucano</b>	27,50±1,37	30,95±0,08
<b>Xilano</b>	25,54±1,33	28,15±0,54
<b>Arabinano</b>	0,45±0,02	0,57±0,06
<b>Ácido Acético</b>	n.d*	6,41±0,23
<b>Lenhina de Klason</b>	29,14±0,33	32,62±0,33
<b>Manose</b>	n.d*	n.d*
<b>Galactose</b>	1,46±0,38	1,46±0,38
<b>Hemicelulose</b>	25,54±1,33	35,28±0,97

a- A análise foi efetuada com 5µL de volume de injeção;~

b- A análise foi efetuada com 20 µL de volume de injeção; \*n.d- Não detetado

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

Da análise global da Tabela 4.2, observa-se que o ácido acético não foi detetado na 1ª caracterização, pois houve um problema na análise do mesmo no HPLC. Uma vez que se reuniram as condições ótimas para a sua evaporação antes de o licor ser analisado no HPLC, na 2ª caracterização já houve o cuidado para que tal não acontecesse uma vez que já foi utilizado volume de injeção mais elevado.

Como se observa pela Tabela 4.2 a quantidade de glucano, xilano e lenhina de Klason são os componentes maioritários. Estes valores são da mesma ordem de grandeza que outros materiais lenhocelulósicos analisados noutros trabalhos publicados<sup>39,40</sup>, no entanto a lenhina de klason é ligeiramente superior<sup>40</sup>.

### **5.1.2. Pré-tratamento com micro-ondas**

#### **5.1.2.1. Ensaio preliminares**

Como referido na alínea 2.4 a utilização de micro-ondas pode ser vantajosa perante outros pré-tratamentos, como tal foram realizados alguns ensaios preliminares para testar o efeito deste pré-tratamento semente.

Fez-se um ensaio inicial com duas variantes: utilização de solução aquosa ácida e utilização de solução aquosa alcalina, onde foi aplicado o mesmo tratamento com micro-ondas. Para controlo, sujeitou-se a amostra às mesmas soluções, durante o mesmo tempo que se aplicou micro-ondas. Para se detetar o efeito das soluções ácida e alcalina, fez-se um ensaio só aplicando água. Resumindo fizeram-se três ensaios, um com ácido, outro com base e outro com água, com e sem micro-ondas usando a potência 119W durante 5 minutos.

A composição da fração líquida obtidas nos tratamentos estão representados na Tabela 5.3.

Foi muito difícil filtrar o licor resultante do tratamento com micro-ondas para ser analisado no HPLC. Com o NaOH não foi de todo possível analisar porque o licor era muito espesso e não foi possível filtrar com os filtros de 0,45µm aconselhados para o HPLC. Este problema pode ser explicado pelo teor de pectinas contido nas sementes, a mesma dificuldade já tinha acontecido durante o ensaio dos extrativos.

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

Tabela 5.3 - Composição em g/L do licor resultante do ensaio em micro-ondas com potência 119W durante 5 minutos com ácido, base e água.

Tratamento	H <sub>2</sub> O		NaOH		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	Com MO	Sem MO	Com MO	Sem MO	Com MO	Sem MO
<b>Glucose</b>	0,01±0,00	0,15±0,00	n.a*	0,17±0,01	0,04±0,02	0,13±0,00
<b>Frutose</b>	0,01±0,00	0,17±0,00	n.a*	0,25±0,00	0,13±0,04	0,18±0,01
<b>Ác. Levulínico</b>	n.d*	n.d*	n.a*	1,34±0,02	n.d*	n.d*
<b>Furfural</b>	n.d*	n.d*	n.a*	0,12±0,00	4,15±0,14	n.d*

\*n.d- não detetado; n.a – não analisado

A análise da tabela 5.3 observa-se que as concentrações de glucose e frutose obtidas no licor sem a utilização do micro-ondas são mais elevados, tanto para o ensaio com água como para o ensaio com ácido sulfúrico, isto pode dever-se ao facto do tempo ou da potência utilizada não ter sido suficiente.

Os valores mais elevados de glucose foram obtidos com solução básica e sem micro-ondas com 0,17 g/L assim como a frutose com 0,25 g/L. Já os valores mais baixos de glucose e frutose foram encontrados no tratamento só com água e com micro-ondas tendo sido 0,01 g/L para ambos os compostos. Estes valores não foram de todo satisfatórios() no entanto há várias situações que podem ter sido responsáveis, como os 119W de potência utilizada, os 5 minutos de exposição, a concentração de 2% de ácido/base utilizada. Dado que os resultados obtidos foram mais satisfatórios em meio ácido e não houve tantas dificuldades a filtrar, optou-se por fazer novos testes com ácido sulfúrico variando as condições de micro-ondas, tempo, potência e o volume utilizado.

#### 5.1.2.2. Ensaio com ácido a 4%

Este ensaio em micro-ondas com solvente ácido é importante para ver se alterando as condições utilizadas no micro-ondas se consegue obter um resultado mais vantajoso comparativamente ao ensaio de hidrólise ácida (solubilização dos açúcares que existem

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

na semente). A insistência na utilização do micro-ondas devesse ao facto de este poder apresentar vantagens, como por exemplo obter igual quantidade de glucose e frutose e menor quantidades de produtos de degradação de açúcares como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, uma vez que existem reportados ensaios noutras biomassas com resultados positivos<sup>19-21,41</sup>, em que foram obtidas concentrações de glucose mais elevadas por g/L. Num dos ensaios reportados foram utilizadas várias condições em micro-ondas como pré-tratamento em palha de arroz, em que o ponto óptimo foram 680W de potência com uma duração de 24 minutos com substratos de concentração 75g/L. Por analogia, neste trabalho também se realizaram uma série de testes com várias potências, tempos e volumes, para tentar alcançar igualmente um ponto óptimo, em que o pré-tratamento se torne mais vantajoso e com melhores resultados do que a hidrólise ácida.

Uma vez que foram feitos ensaios com três variantes, será analisado o efeito que cada variável teve no pré-tratamento sobre a semente: o tempo, o volume de ensaio e a potência utilizada.

### **Efeito do tempo**

Foram realizados 2 ensaios com a mesma potência (539 w) e com o mesmo volume (125 ml) alterando apenas o tempo de aplicação da radiação, 5 minutos e 10 minutos. Os resultados estão representados na tabela 5.4.

Quanto aos valores de glucose, foram superiores no tratamento com 10 minutos, sendo de 5,861 g/L, já a frutose foi superior em 5 minutos, sendo de 2,286 g/L. No que diz respeito aos inibidores hemi-furfural e furfural foram superiores no tratamento em 5 minutos, 5,572 g/L e 0,598 g/L respetivamente, enquanto que no tratamento com 10 minutos o hemi-furfural não foi detetado.

Observa-se que os únicos compostos que aumentaram dos 5 minutos para os 10 foi a glucose, aumentando de 1,76 g/L para 5,9 g/L, e o ácido fórmico de 0,2 g/L para 3,9 g/L. Os restante elementos diminuíram. Parte do aumento do ácido fórmico deve-se à degradação do furfural e da arabinose que nos 5 minutos de reacção existia 0,6 g/L e 1,3 g/L, respetivamente, e que ao fim de 10 minutos reduziram para 0,02 g/L e 0,34 g/L, respetivamente. A redução do ácido acético, que em 5 minutos existia em 1,7 g/L e nos

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

10 minutos deixou de ser detetado, pode estar relacionado com a característica principal deste composto, que é a volatilidade. Uma vez que é bastante instável pode ter evaporado com o tempo prolongado de exposição à radiação micro-ondas.

Tabela 5.4 - Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas durante 5 e 10 minutos na potência 539W e com o volume 125 mL

Composição		
Tempo (min)	5	10
Glucose	1,760±0,04	5,861±0,00
Frutose	2,286±0,05	0,040±0,00
Arabinose	1,263±0,04	0,339±0,00
Ác. Fórmico	0,158±0,03	3,922±0,00
Ác. Acético	1,666±0,05	n.d*
Hemi-furfural	5,572±0,32	n.d*
Furfural	0,598±0,04	0,022±0,00

\*n.d – não detetado

Conclusão, o aumento de exposição da semente à potencia média alta (PMA) (539W) promove o aumento de glucose mas forma-se maiores quantidades ácido fórmico.

#### Efeito da potência

Relativamente aos resultados do efeito da potência nos ensaios de micro-ondas sobre a semente estão referidos na tabela 5.5.

Nesta situação a potência mais elevada fez com que os açúcares e ácidos analisados tivessem aumentado com excepção do furfural que desceu de 0,60 g/L para 0,02 g/L e do hemi-furfural que deixou de ser detectável à PA. Isto pode ser explicado pela degradação de furfural para o ácido fórmico que em consequência aumentou de 0,16 g/L para 1,31 g/L (ver figura 7). Os resultados mais apelativos são relativamente à glucose e à frutose que aumentaram mais de 60%. Mas conclui-se que a utilização de

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

uma potência mais elevada (700W) foi mais vantajoso porque foi conseguido uma maior quantidade de açúcares e menos de furfural e hemi-furfural, embora se tenham criado inibidores como o ácido acético, com 3,1 g/L, e ácido fórmico, com 1,3 g/L.

**Tabela 5.5 – Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas nas potências PMA (539 W) e PA (700 W) durante 5 minutos e com 125 mL de volume**

<b>Composição (g/L)</b>		
<b>Potência (W)</b>	<b>539</b>	<b>700</b>
<b>Glucose</b>	1,760±0,04	2,714±0,30
<b>Frutose</b>	2,286±0,05	3,433±0,21
<b>Arabinose</b>	1,263±0,04	1,930±0,10
<b>ác. fórmico</b>	0,158±0,03	1,308±0,04
<b>Ác. Acético</b>	1,666±0,05	3,054±0,47
<b>Hemi-furfural</b>	5,572±0,32	n.d*
<b>Furfural</b>	0,598±0,04	0,022±0,00

\*n.d – Não detetado

### **Efeito do volume**

Para a variante do volume foram feitos quatro ensaios em duas condições diferentes. Dois dos ensaios foram feitos em 5 minutos com potencias diferentes e outros dois em 10 minutos com as mesmas potências que foram usadas nos estudos com 5 min. mas o elo de comparação será o volume.

Na tabela 5.6 estão representados os resultados em que foram utilizados os volumes 250 e 125 mL a PMA (539W) durante 5 minutos.

Analisando os valores da Tabela 5.6 observa-se que para um menor volume houve produção de maiores quantidades de açúcares, isto é os valores de glucose e frutose foram maiores o volume de 125 mL, 1,8 g/L e 2,3 g/L respectivamente, em vez dos 1,4 g/L e 1,8 g/L com volume de 250 mL. Nesta situação há um inconveniente que não se fez notar tanto nos ensaios anteriores que são os valores de ácido acético, hemi-furfural

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

e furfural. Estes compostos inibidores não foram detetados no ensaio com 250 mL, no entanto com 125 mL já se obteve valores muito elevados como 1,67g/L para o ácido acético, 5,6 g/L para o hemi-furfural e 0,6g/L de furfural. Estes valores podem ter resultados do fato de um volume menor, 125 mL, permitir atingir temperaturas mais elevadas mais rapidamente do que com um volume maior, 250 mL, apesar de ambas as amostras estarem sujeitas à mesma radiação.

**Tabela 5.6- – Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas com 250 e 125 mL de volume, em 5 minutos de radiação e 539 W de potência**

<b>Composição</b>		
<b>Volume (mL)</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
<b>Glucose</b>	1,361±0,08	1,760±0,04
<b>Frutose</b>	1,788±0,19	2,286±0,05
<b>Arabinose</b>	n.d*	1,263±0,04
<b>Àc. Fórmico</b>	0,181±0,03	0,158±0,03
<b>Ác. Acético</b>	n.d*	1,666±0,05
<b>Hemi-furfural</b>	n.d*	5,572±0,32
<b>Furfural</b>	n.d*	0,598±0,04

\*n.d –Não detetado

Na tabela 5.7 mante-se a comparação entre volumes, em que é comparada a composição dos licores em que se utilizou 500 mL e 125 mL de volume, com potência 539W durante 10 minutos.

Tal como na situação acima, o ensaio com menor volume (125 mL) produziu maiores quantidades de glucose (5,9 g/L) de glucose enquanto que com o ensaio com 500 mL obteve-se 1,3 g/L. O ácido fórmico também aumentou para 3,9 g/L, tal como nas situações anteriores devido à degradação dos açúcares, enquanto que a frutose diminuiu ligeiramente de 1,7 g/L para 0,04 g/L. Apesar de ter-se feito o ensaio num tempo mais prolongado (10 min.) tempo utilizado pode não ter sido suficiente ter efeito

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

equivalente aos 5 min. num volume de 500 mL. Um maior volume implica que também temos uma maior quantidade de biomassa para reagir.

Tabela 5.7 -- Composição dos licores resultantes do ensaio em micro-ondas com 500 e 125 mL de volume, 539 W de potência durante 10 minutos

Composição (g/L)		
Volume (mL)	500	125
Glucose	1,346±0,02	5,861±0,00
Frutose	1,715±0,02	0,040±0,00
Arabinose	n.d*	0,339±0,00
Ác. Fórmico	1,308±0,01	3,922±0,00
Ác. Acético	1,209±0,30	n.d*
Hemi-furfural	0,055±0,00	n.d*
Furfural	0,208±0,00	0,022±0,00

\*n.d – Não detetado

Comparativamente aos resultados apresentados na Tabela 4.6, para o volume de 250mL (Tabela 5.6) e 500 mL (Tabela 5.7) observa-se que a exposição durante um maior tempo com um volume maior aumentou a produção dos diferentes produtos de degradação dos açúcares. O efeito do tempo de exposição foi maior do que o efeito do volume.

### 5.1.3. Hidrólise ácida diluída

O estudo de hidrólise ácida diluída efetuado teve como objetivo avaliar a possibilidade de sacarificar a glucose e xilose dos componentes estruturais como a celulose e hemicelulose para evitar a utilização de enzimas que encarece o processo de produção de etanol.

Para este processo foi utilizada a semente.



## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

No processo de hidrólise ácida diluída a 4% foram medidos os compostos nos hidrolisados e a percentagem de sólidos recuperados. Os resultados estão presentes na tabela 5.8.

Analisando a tabela 5.8 observa-se que foram recuperados 62% dos sólidos tratados, que poderá corresponder a grosso modo aos 62% da constituição da casca antes do tratamento correspondente à fração de glucano e lenhina de Klason. No licor foi detetado 2,4 g/L de glucose, 12,8 g/L de xilose, 5,7 g/L de ácido acético, 5,2 g/L de hemi-furfural e 1,1g/L de frufural.

Tabela 5.8 – Composição dos licores resultantes do estudo da hidrólise ácida diluída a 4%

Composto	Composição	
	g/L	% (g/100g)
<b>Sólidos recuperados</b>	-	62
<b>Glucose</b>	2,4±0,0	1,2±0,1
<b>Xilose</b>	12,8±0,4	6,3±0,1
<b>Ácido Acético</b>	5,7±0,2	1,6±0,0
<b>Hemi-furfural</b>	5,2±0,2	2,4±0,2
<b>Furfural</b>	1,1±0,1	11,4±0,6

Analisando a figura 7 na secção 2.6.1, pode-se concluir que a hemicelulose que existiria no licor sepode ter degradado e ter dado origem à xilose e ao ácido acético presentes nos resultados com cerca de 6,3% e 1,6% respectivamente, como vem referido na tabela 5.8.

O inconveniente deste ensaio é sem dúvida os valores obtidos de hemi-furfural e furfural, uma vez que junto com o ácido acético são inibidores da fermentação. Estes valores elevados de inibidores pode estar relacionado com a concentração do ácido utilizado na hidrólise ácida.

#### 5.1.4. Sacarificação enzimática

##### 5.1.4.1. Semente sem pré-tratamento

Foi realizada a sacarificação da semente original para se poder comparar com a sacarificação dos resíduos que resultaram dos diferentes pré-tratamentos a que foi sujeito a semente, afim de servir como um controlo para analisar. O objetivo é concluir se há vantagem em fazer os pré-tratamentos, uma vez que o pré-tratamento é uma das partes que encarece o processo de produção de bioetanol..

A sacarificação da semente original foi analisada de 24 em 24h com uma duração total de 72h. Foi também calculado o rendimento da sacarificação com base na composição feita no ponto 5.1.1. A concentração de glucose e xilose obtidos na sacarificação ao longo do tempo estão apresentados na figura 11.

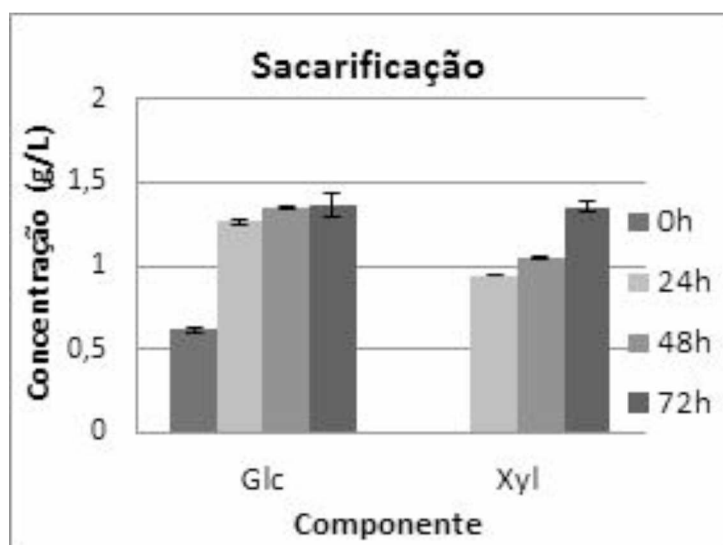


Figura 11 – Representação gráfica da concentração de glucose e xilose ao longo da sacarificação

Analisando os níveis de glucose e xilose ao longo da sacarificação é notável que ambos os compostos vão aumentando ao longo do processo, na hora 0, a glucose não chegava a 1g/L e a xilose não foi detetada, no final ambos os compostos foram superiores a 1g/L. A maior diferença é na xilose uma vez que não foi detetada na primeira análise, ou seja, no início do processo. Para a glucose o maior aumento

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

verificou-se nas primeiras 24h, depois permaneceu praticamente constante. Já para a xilose o maior aumento observou-se nas primeiras e nas últimas 24h. O rendimento da sacarificação foi de 3%.

### Semente sem pectinas

Dado os resultados obtidos nos ensaios anteriores, optou-se por retirar as pectinas da semente, e verificar as diferenças na sacarificação. As pectinas foram retiradas para comparar com os ensaios anteriores com o intuito de comparar relativamente ao rendimento, para se concluir se a presença das pectinas afecta o processo de sacarificação enzimática. Esta sacarificação foi feita com a *celluclast 1.5L* e a *Novozyme 188*, nas mesmas condições indicadas no ponto 4.4.

Tabela 5.9 – Concentração de glucose, xilose e arabinose na sacarificação da semente sem pectinas e na semente tal e qual ao fim de 72h

Composto	Concentração (g/L)	
	Sem pectinas	Tal e qual
<i>Glu</i>	0,8989 ±0,1300	1,3707 ±0,0711
<i>Xyl</i>	0,4466 ±0,0510	1,3546 ±0,0359
<i>Ara</i>	1,2618 ±0,2036	

Na tabela 5.9 estão representados os resultados de ambas as sacarificações anteriores o fim de 72h de ensaio. Relativamente à glucose e xilose os resultados foram superiores na semente tal e qual, sendo 1,37g/L de glucose e 1,35 g/L de xilose. Na semente sem pectinas os resultados foram praticamente metade, sendo 0,90 g/L de glucose e 0,45g/L de xilose.

#### 5.1.4.2. Semente pré-tratada com micro-ondas

Dado os resultados obtidos durante o pré-tratamento com micro-ondas optou-se por verificar também a influência da potência, do volume e do tempo utilizado neste pré-tratamento sobre a hidrólise enzimática. A condições de sacarificação foram iguais

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

para todos os ensaios. Foi usada a *Celluclast 1.5L* e a *Novozyme 188* numa proporção de 15 FPU e 7.5 CBU por grama de biomassa seca respetivamente.

Uma vez que na sacarificação com a semente pré-tratada foi analisada a influência do tempo, da potência e do volume, para cada variância foi aplicado o método estatístico ANOVA com um factor de variância.

### Efeito do tempo

Os resultados da sacarificação sobre a semente pré-tratada com diferentes tempos encontra-se na tabela 5.10.

**Tabela 5.10 – Concentração de glucose, xilose e arabinose obtidos com a sacarificação da semente pré-tratada com micro-ondas a PMA durante 5 e 10 minutos**

Concentração g/L		
Tempo (min)	5	10
<b>Glu</b>	1,6279±0,012	1,3909±0,032
<b>Xyl</b>	0,9871±0,004	1,1239±0,039
<b>Ara</b>	1,0668±0,076	1,2842±0,005

Comparando a sacarificação nas biomassas com diferentes pré-tratamentos não se distingue uma grande diferença, uma vez que os resultados estão muito próximos. A sacarificação da xilose e da arabinose foi maior quando pré-tratado durante 10 minutos, de 0,99 g/L para 1,12 g/L no caso da xilose e 1,07 g/L para 1,28 g/L no caso da arabinose. Já para a glucose a sacarificação foi ligeiramente superior na semente tratada em 5 minutos, sendo de 1,63 g/L em vez dos 1,4 g/L que se obteve na biomassa com 10 minutos.

Analisando com o método estatístico ANOVA que está representado no anexo A não há uma diferença significativa entre os tempos de 5 minutos e 10 minutos no pré-tratamento da semente, para os ensaios de sacarificação.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

### Efeito da potência

Relativamente ao efeito da potência utilizada no micro-ondas sobre a sacarificação, a concentração de glucose, xilose e arabinose obtidas no final do processo encontram-se na tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose obtidos com a sacarificação da semente pré-tratada em micro-ondas com potências diferentes, com o mesmo volume e durante o mesmo tempo.

Concentração g/L		
Potência (W)	539	700
Glu	1,6279±0,013	1,5316±0,315
Xyl	0,9871±0,004	1,1014±0,262
Ara	1,0668±0,076	1,4575±0,310

Observando a tabela 5.11 também não há uma grande diferença entre os diferentes compostos. As diferenças entre a glucose e a xilose nas duas potências é cerca de 0,10 g/L apenas a concentração de arabinose foi mais elevada, em que na potência 539W foram obtidos 1,07 g/L e nos 700W cerca de 1,46 g/L.

Em termos estatísticos também não existe uma diferença significativa entre as diferentes potências.

### Efeito do volume

Tal como no pré-tratamento também foi feita a sacarificação das biomassas que foram tratadas com diferentes volumes e daí haver duas comparações que se podem analisar em termos de volumes. A tabela 5.13 é composta pelos resultados da sacarificação com os volumes 250 e 125 mL, com a potência A (700W) durante 5 minutos.

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

Tabela 5.12 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose obtida com a sacarificação da semente pré-tratada em micro-ondas a 700W com diferentes volumes, 250 e 125 mL.

Concentração g/L		
Volume (mL)	250	125
<b>Glu</b>	1,7931±0,076	1,6279±0,012
<b>Xyl</b>	1,0118±0,039	0,9871±0,004
<b>Ara</b>	1,1017±0,065	1,0668±0,076

Nesta situação os valores também são muito semelhantes nos dois ensaios, no entanto os valores ligeiramente mais altos são para a amostra em que foi utilizado um volume de 250 mL. A glucose foi de 1,79 g/L e 1,63 g/L nos volumes de 250 mL e 125 mL, respectivamente. A xilose e a arabinose foi de 1,01 e 1,10 g/L respectivamente para os 250 mL enquanto que para os 125 mL foi de 0,99 g/L e 1,07 g/L respectivamente.

Na tabela 5.13 estão representados igualmente diferentes volumes, entre 125 e 500mL com a potência MA (539W) durante 5 minutos.

Tabela 5.13 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose obtida com a sacarificação da semente pré-tratada em micro-ondas com diferentes volumes, 500 e 125mL e tempo de tratamento.

Concentração g/L		
Volume mL	500	125
<b>Glu</b>	1,9746±0,010	1,3909±0,032
<b>Xil</b>	1,0963±0,010	1,1239±0,039
<b>Ara</b>	1,3958±0,067	1,2842±0,005

Neste ensaio, uma vez que se trata de uma diferença de volumes mais elevada que no ensaio anterior também se nota uma maior diferença em termos de valores, principalmente na glucose, em que o maior volume obteve 1,97 g/L enquanto que no menor volume obteve apenas 1,39 g/L. A arabinose também foi mais elevada nos 500 mL com 1,40 g/L em vez de 1,28 g/L que foram obtidos nos 125 mL. Já a xilose obteve

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

maior valor quando foi utilizado o volume de 125mL, sendo de 1,12 g/L enquanto que nos 500 mL foi de 1,10 g/L. Comparando a tabela 5.12 e 5.13, confirma-se que o maior volume obteve o valor mais elevado de glucose.

A análise estatística, relativamente à variação de volume, tanto na tabela 5.12 e 5.13 não há qualquer relação nos resultados obtidos. Ou seja, não há relação dos resultados obtidos com a diferença de volumes.

### 5.1.4.3. Hidrólise ácida

Foi realizada a sacarificação do sólido resultante da hidrólise ácida da semente.

Os resultados relativamente à glucose, xilose e arabinose estão apresentados na tabela 5.14.

Tabela 5.14 – Concentração de Glucose, Xilose e Arabinose resultante da sacarificação do sólido da hidrólise ácida diluída

Composto	Composição g/L
Glu	3,3716 ± 0,075
Xil	0,5349 ± 0,019
Ara	1,4154 ± 0,028

Observando a tabela 5.14, conclui-se que comparando todas as sacarificações realizadas sobre a semente o valor de glucose foi mais elevado nesta situação, sendo de 3,37 g/L. Os outros compostos, xilose e arabinose, são idênticos aos resultados obtidos anteriormente, 0,53 g/L de xilose e 1,42g/L de arabinose.

### 5.1.5. Fermentação

A fermentação foi realizada com a biomassa resultante da sacarificação da biomassa original. Para haver a possibilidade de comparação, foi feito um ensaio com enzima e outro sem enzima. A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* e utilizou-se o meio YPD. Foram então registados os valores de açúcares e de etanol durante a fermentação com duração de 24h. Na figura 12 está representado o perfil da concentração de glucose, frutose ou xilose e de etanol ao longo da fermentação.

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

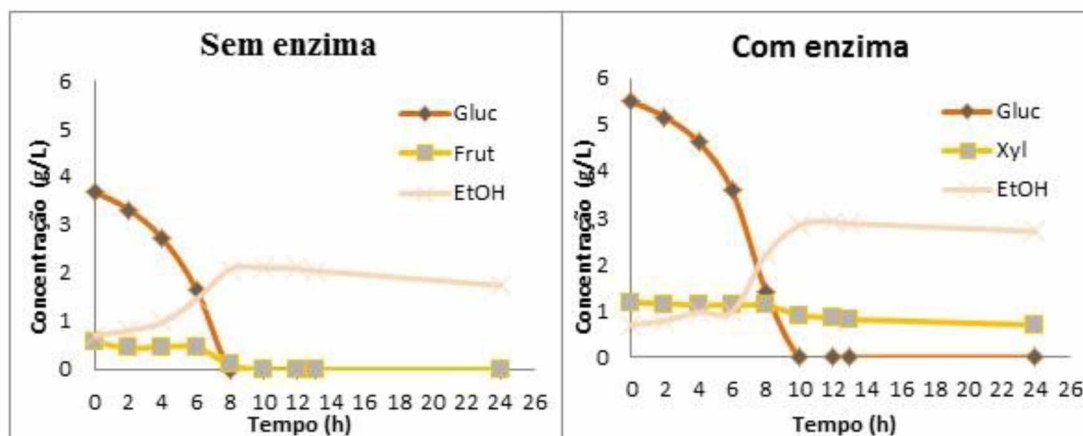


Figura 12 – Representações gráficas da concentração de glucose, frutose ou xilose e etanol na fermentação ao longo das 24h sem enzima e com enzima

Pelo perfil de fermentação da semente, pode-se observar que a adição de enzima teve um efeito positivo contribuindo para o aumento da concentração de açúcares no início da fermentação e, em consequência a concentração de etanol obtida ao fim de 24h. Como se pode observar pelo gráfico o valor de etanol foi aumentando à medida que se foi consumindo a glucose. Ao fim das 24h a glucose já tinha sido totalmente convertida. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Concentração de etanol e eficiência da fermentação obtidos no processo de fermentação com *S. cerevisiae* NCYC-1119

Substrato	Enzima	Etanol g/L	Eficiência da fermentação %
Semente	Sim	2,7	71 ± 2
	Não	1,8	48 ± 3

A concentração de etanol obtida no ensaio sem enzima foi de 1,8 g/L enquanto que no ensaio com enzima foi de 2,7 g/L. Conclui que houve vantagem em usar-se a enzima, tanto que houve uma eficiência de fermentação de 71% enquanto que sem enzima foi apenas de 48%.



## 5.2. Casca

### 5.2.1. Preparação

Foram recebidas amostras de casca do Figo-da-Índia em duas alturas diferentes. A casca que foi recebida em Setembro designa-se por casca A e a casca B foi recebida em Novembro. A casca A, uma vez que foi em menor quantidade apenas foi caracterizada, não sendo possível prosseguir com outros ensaios. A casca B uma parte foi seca para se proceder à sua caracterização, outra foi moída na “Bimbi” com a velocidade 7 e as amostras resultantes foram congeladas em porções mais pequenas para posteriores ensaios, e uma parte foi congelada tal como se recebeu. Na figura 13 está representada a casca que foi tratada para a caracterização como indicado no capítulo 3.1.



Figura 13 – Representação da casca cortada em tiras; seca a 40°C e moída em partículas inferiores ou iguais a 1mm, respectivamente.

### 5.2.2. Caracterização

Para a caracterização foram feitos os procedimentos de cálculo dos sólidos totais e das cinzas, tal como para a semente. A caracterização está apresentada na tabela 5.16. Para a determinação do teor de extratáveis em água as condições foram as mesmas que para a semente. Durante este procedimento foi-se notando uma ligeira diferença de cor entre as cascas. A casca B apresentou uma cor ligeiramente mais viva do que a casca A. Isto porque provavelmente uma das cascas continha mais polpa e por isso tomando uma cor mais escura derivado à quantidade de açúcares. Por outro lado os extratáveis de ambas as cascas apresentaram uma cor mais escura que os extratáveis da semente. Tal como ocorreu com a semente a duração da extração com água foi aproximadamente de 25h, com etanol levou 27h. Podemos confirmar a cor de ambas as extrações na figura 11, que se encontra na secção 5.1.1, as extrações da casca húmida dizem respeito aos números 7 e 8, da casca A os números 3 e 4 e da casca B os números 5 e 6. A

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

percentagem de extratáveis e a quantidade de azoto e de proteína bruta estão representados na tabela 5.16.

Tabela 5.16 – Teores de humidade, cinzas, extratáveis em água, extratáveis em etanol, proteína e de azoto presentes na Casca A e B respectivamente.

Característica (%)	Casca A	Casca B
<b>Humidade</b>	12,09±0,12	17,55±0,02
<b>Cinzas</b>	22,87±0,03	12,61±0,04
<b>Extratáveis em água</b>	36,33±2,49	54,04±4,43
<b>Extratáveis em etanol</b>	4,21±0,89	2,32±0,63
<b>Proteína bruta</b>	2,90±0,82	4,14±0,19
<b>Azoto</b>	0,46±0,13	0,66±0,03

Tendo em conta os resultados a casca A pode-se afirmar que tem mais cinzas do que a casca B, sendo 22,9% e 12,6% respectivamente. A casca B apresentou um teor de humidade superior ao da casca A, mais cerca de 5,4%, tendo a casca A cerca de 12,1%. Relativamente aos extratáveis a casca A tem mais extratáveis em etanol, cerca de 4,2%, e a casca B tem mais extratáveis em água, com 54,0%. Quanto À proteína a casca B é composta pelo dobro do da casca A. Estas diferenças entre as cascas, embora as amostras sejam da mesma espécie, são facilmente explicadas pelo facto de não terem sido recolhida na mesma altura, o que pode indicar que uma foi recolhida numa zona da plantação e por isso apresenta teores diferentes, no entanto o principal motivo foi o facto de a casca B ser constituída por mais polpa que vinha na casca do que na 1ª casca que foi recebida, neste sentido a maior quantidade de polpa tornou a amostra mais diluída.

Comparando a caracterização das cascas com a caracterização da semente conclui-se que a semente tem menos humidade, cinzas e extratáveis em água que ambas as cascas. No entanto quanto à proteína bruta é mais elevada. A elevada percentagem de extratáveis em água da casca pode dever-se ao facto da presença de polpa de *OFI* que existia junto à casca. Os valores de açúcares obtidos na fracção aquosa são um

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

indicativo da presença de açúcares solúveis, o que é uma vantagem na obtenção de açúcares para a sua posterior utilização nos processos fermentativos.

A restante caracterização foi feita como descrito no capítulo 3.1. A composição das duas cascas encontra-se na tabela 5.17.

Tabela 5.17 – Caracterização da casca A e casca B livre de extrativos em %

Composição %	Casca A	Casca B
<b>Glucano</b>	22,20±0,34	27,32±1,14
<b>Xilano</b>	13,37±0,14	12,53±0,20
<b>Arabinano</b>	3,49±0,05	1,98±0,12
<b>Ácido acético</b>	1,50±0,01	n.d*
<b>Lenhina de Klason</b>	4,64±0,13	6,13±0,15
<b>Manose</b>	10,35±0,09	n.d*
<b>Galactose</b>	5,66±0,29	2,33±0,24

\*n.d- não detetado

Relativamente aos compostos analisados no HPLC que se apresentam na tabela 5.17, a casca A é mais rica em xilano, 13,37%, arabinano 3,49 %, ácido acético, 1,5 %, manose, 10,35%, e galactose 5,66%. A casca B comparada com a casca A apenas possui mais glucano, 27,32%, e lenhina de Klason, 6,13 %.

Relembrando a caracterização da semente na tabela 5.2 na secção 5.1, é notório que a semente é mais rica em glucano, xilano e lenhina de Klason do que a casca. No entanto a casca apresenta vantagem de apresentar um elevado teor de açúcares solúveis. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a caracterização realizada noutro estudo do figo-da-índia<sup>42</sup>, em que mostrou que o componente mais abundante da casca do *OFI* foram os hidratos de carbono solúveis em etanol.

Tal como indicado em cima, da casca A apenas foi feita a caracterização dada a insuficiência em termos de biomassa para continuar com os pré-tratamentos e

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

tratamentos. Como tal, daqui para a frente todos os tratamentos realizados é sobre a casca B, sendo designada apenas por casca.

### 5.2.3. Pré-tratamentos

#### 5.2.3.1. Testes preliminares com micro-ondas

Os ensaios de micro-ondas foram realizados tal como na semente, com duas variantes: ácido, base ou água e a utilização ou não de micro-ondas. Os resultados dos ensaios encontram-se na tabela 5.19.

Tabela 5.18secção – Composição em g/L do licor resultante do ensaio em micro-ondas com potência 119W durante 5 minutos com ácido, base e água.

Tratamento	H <sub>2</sub> O		NaOH		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	C/ MO	S/ MO	C/MO	S/ MO	C/MO	S/MO
<b>Glucose</b>	8,783±0,10	18,099±0,15	n.a*	15,751±0,37	4,602±3,97	15,381±0,37
<b>Frutose</b>	11,503±0,13	23,500±0,18	n.a*	19,876±0,09	10,660±0,50	20,300±0,34
<b>Ác.</b>	0,099±0,00	0,198±0,00	n.a*	0,239±0,00	0,060±0,03	0,163±0,00
<b>Levulínico</b>						
<b>Furfural</b>	n.d*	n.d*	n.a*	n.d*	0,458±0,04	1,752±1,55

\*n.d – Não detetado; n.a – não analisado

Tal como se sucedeu com a semente os resultados obtidos com solução básica, com o NaOH, não produziu melhores resultados quando comparado com o não tratado com micro-ondas, por outro lado, não foi possível filtrar o licor para análise no tratamento com micro-ondas. Nesta situação em que utilizamos a casca o melhor resultado de glucose e frutose foi obtido sem micro-ondas e com água, sendo de 18,1g/l e 23,5g/L respetivamente. Os valores mais baixos obtidos foram com a utilização de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com micro-ondas, sendo 4.6g/L de glucose e 10,7g/L de frutose. Relativamente a inibidores detetou-se cerca de 1,8g/L de furfural sem a utilização de MO e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

5.2.3.2. *Hidrólise ácida diluída*

O processo de hidrólise ácida foi realizado sobre a casca. Foram medidos os compostos presentes nos hidrolisados e a percentagem de sólidos recuperados. Estes resultados são visíveis na tabela 5.18.

Tabela 5.19 – Composição dos licores resultantes do estudo da hidrólise ácida diluída

Composto	Composição	
	g/L	% (g/100g)
<b>Sólidos recuperados</b>	-	11
<b>Glucose</b>	8,0±0,0	32,4±0,3
<b>Xilose</b>	1,9±0,1	7,5±0,3
<b>Ácido acético</b>	3,7±0,1	9,2±0,0
<b>Hemi Furfural</b>	>10	>36,8
<b>Furfural</b>	n.d*	-

\*n.d – Não detetado

O valor de glucose, analisando a tabela 5.18, é de 8 g/L o que equivale a 11% tendo em conta o peso seco; 7,5% corresponde à xilose e 9,2% corresponde a ácido acético, obtendo um valor elevado de hemi-furfural, cerca de 36,8%.

Relembrando a figura 12 na secção 5.1.3. conclui-se que o elevado furfural e ácido acético poderá corresponder à hemicelulose que se degradou até originar uma pequena parte de xilose e o restante em furfural e ácido acético.

#### 5.2.4. Sacarificação enzimática

##### 5.2.4.1. Casca seca

Para os ensaios de sacarificação foram utilizadas novamente a celluclast 1,5L e Novozyme 188 numa proporção de 30 FPU e 15 CBU para um volume final de 100 mL. Foram retiradas as amostras de 24 em 24h. As concentrações de glucose e frutose ao longo do tempo estão representadas na figura 14.

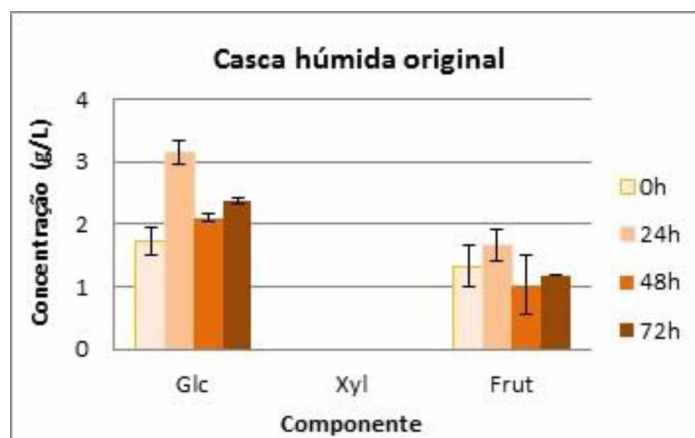


Figura 14 – Representação gráfica da concentração de glucose e frutose ao longo do ensaio da sacarificação

Analisando a figura conclui-se que houve um pico de glucose na segunda medição, ou seja, nas 24h do ensaio, no entanto depois na medição seguinte a glucose desceu mais de 1 g/L, no entanto ainda foi subindo até ao final do ensaio. O mesmo sucedeu relativamente à frutose, mas não foi uma diferença tão grande como na glucose e tendo a particularidade de que a frutose obtida no final do ensaio foi mais baixa do que a que tínhamos inicialmente, uma vez que não faz parte dos constituintes estruturais da casca. O rendimento obtido da sacarificação da casca original foi de 19%, o que comparado com a semente já foi um resultado mais favorável.

##### 5.2.4.2. Casca lavada com água

Dado os resultados obtidos com a casca anterior na sacarificação optou-se por realizar uma sacarificação sobre a casca sem os extrativos, isto para concluir se os resultados obtidos não seriam falsos resultados uma vez que a casca tem um teor elevado em açúcar solúveis. A glucose e frutose obtidos na sacarificação da casca tal e

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

qual podem ser resultados falsos, uma vez que esta quantidade de açúcares pode corresponder aos açúcares da polpa que ainda contem a casca e não do processo em si.

Na figura 15 pode-se observar os resultados.

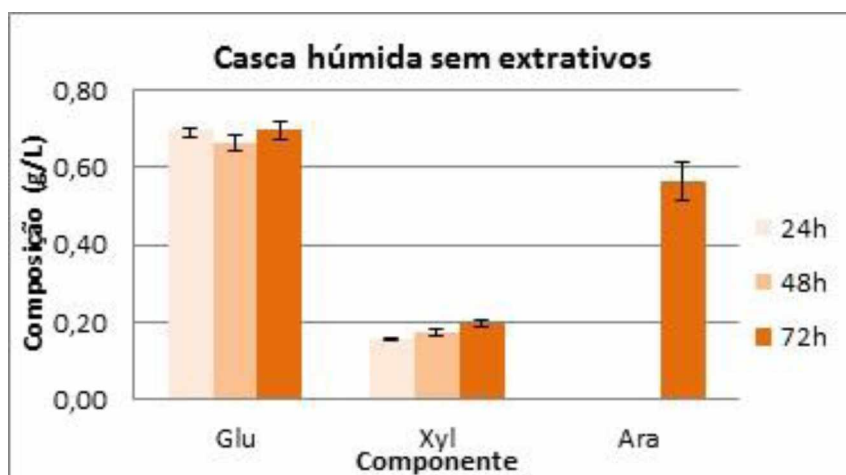


Figura 15 – Representação gráfica da concentração de glucose, xilose e arabinose ao longo da sacarificação da casca lavada com água

Nesta situação já se pode observar alguma concentração de xilose, embora pouca, e esta vai aumentando ao longo do tempo embora não seja significativo. Já a arabinose apenas foi detetada na última medição mas não chega a 0,60 g/L. A glucose foi-se mantendo ao longo do tempo constante. Estes resultados confirmam que os resultados da sacarificação da casca com extrativos foram falsos resultados uma vez que o valor da glucose foi muito baixo e não se mostrou alterada ao longo do tempo. Quanto ao rendimento foi também mais baixo sendo cerca de 5%. No entanto foi superior ao da semente que foi de 3%.

### 5.2.4.3. Casca lavada com água e seca

Para este ensaio optou-se por depois de se retirar os extrativos da biomassa secar a mesma a 40°C e triturar. As condições utilizadas foram as mesmas dos ensaios anteriores para se poder comparar. As concentrações de glucose e de xilose obtidas na ensaio estão representadas na figura 16.

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol



Figura 16 – Representação gráfica das concentrações de glucose e xilose às 72h da sacarificação da casca lavada com água e seca.

Considerando os valores obtidos e comparando com os dados obtidos nos ensaios anteriores, este ensaio foi o que obteve melhores resultados. O valor de glucose por g/L foi o mais alto dos ensaios, e não se trata de um falso resultado uma vez que a esta biomassa foram retirados os extrativos antecipadamente.

Depois desta sacarificação seria interessante prosseguir com a fermentação para termos conhecimento da quantidade de etanol que se poderia atingir, uma vez que tivemos um rendimento de mais de 40%.

### 5.2.5. Fermentação

A fermentação foi realizada com o sólido resultante da sacarificação da casca seca. Para a fermentação foram feitos dois ensaios, um com enzima outro sem, tal como sucedeu com a semente.

Os perfis da evolução dos açúcares e etanol ao longo do tempo da fermentação estão representados na figura 17.

Analisando a figura conclui-se que a adição da enzima não é crucial para a produção de etanol, uma vez que existe uma quantidade de açúcares solúveis disponíveis para a fermentação. Neste ensaio também foi difícil filtrar os sobrenadantes para se analisar no HPLC. Na tabela 5.20 pode observar-se a eficiência da fermentação tanto com enzima como sem enzima.



## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

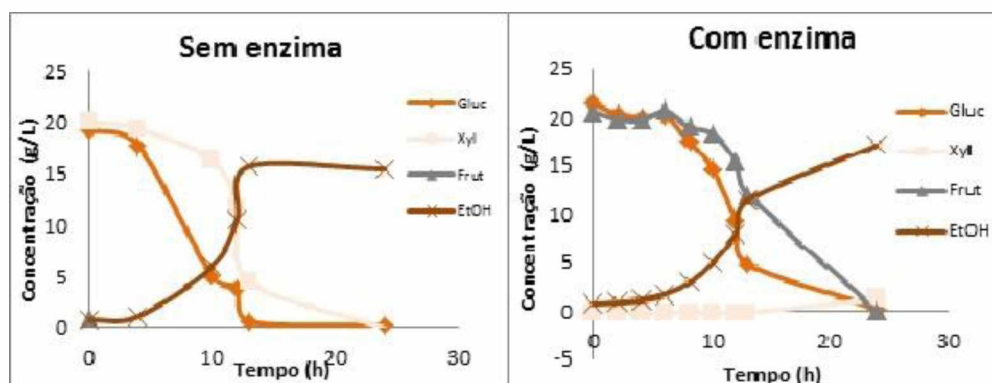


Figura 17 – Representação gráfica do perfil da casca seca sem e com adição de enzimas ao longo do tempo

Tabela 5.20- Concentração de etanol e eficiência da fermentação obtidos no processo de fermentação

Substrato	Enzima	Etanol g/L	Eficiência da fermentação %
Casca seca	Sim	17,1	76±0
	Não	15,3	74±0

Como se pode observar não há uma diferença grande entre a utilização da enzima ou não. Uma vez que o processo de obtenção de etanol é dispendioso em grande parte devido à utilização de enzimas, esta biomassa pode ser importante no avanço da fermentação, uma vez que não são necessárias enzimas uma vez que ela própria contém os componentes necessários para a fermentação.

Comparando com os resultados da semente, obtidos no capítulo 5.1.5., a eficiência de fermentação foi bastante mais alta sem ser necessário utilizar a enzima, o que não se verificou no caso da semente.

## 6. Conclusões

A casca do *OFI* mostrou mais humidade, mais cinzas e mais extratáveis em água do que a semente, o que já seria esperado uma vez que junto com a casca vem também polpa, enquanto que a semente já tinham sido retirados os óleos.

Nos ensaios preliminares de micro-ondas utilizando diferentes soluções, tanto para a semente como para a casca, os resultados obtidos não se mostraram vantajosos, uma vez que a concentração de glucose e frutose foi mais baixa do que quando não se utilizou micro-ondas. A análise feita relativamente ao efeito de tempo, do volume e da potência utilizada não mostrou que houvesse uma diferença significativa com a alteração destes componentes. A hidrólise ácida revelou melhores resultados que todos os ensaios efetuados no micro-ondas.

O rendimento das sacarificações realizadas não foi tão elevado quanto o esperado, no entanto, a aplicação de outros pré-tratamentos pode ser a solução para tornar este processo mais rentável.

Quanto às fermentações, a eficiência com a casca original foi de 76%, o que apresenta um bom resultado, já para a semente foi apenas de 48% quando não utilizada enzima. Este valor para a casca significa que não é necessário utilizar enzimas para a fermentação com a casca uma vez que ela apresenta os açúcares necessários para o fazer. Tendo em conta os açúcares disponíveis para a fermentação, esta mostrou-se com uma boa eficiência.

Os resultados da casca foram mais vantajosos uma vez que esta continha uma elevada quantidade de açúcares.

No final foi obtido 15,3 g/L de etanol a partir da casca e 2,7 g/L a partir da semente.

Pode-se concluir que o potencial de conversão de açúcares em etanol é muito maior para a casca do que para a semente do *OFI*, devido à elevada quantidade de açúcares solúveis que a casca apresentou. Uma vez que os valores obtidos com a utilização e não utilização de enzima durante a fermentação foram semelhantes para a casca, também se pode concluir que é mais rentável a casca no que diz respeito à fermentação, até porque

## Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes para a Produção do Bioetanol

durante os processos de pré-tratamento a semente apresentou alguns entraves, devido ao teor de pectinas.

No entanto, ambos os resíduos têm um bom potencial para produção de etanol. São necessários mais ensaios e estudos em pré-tratamentos para tornar este processo mais rentável.

## Bibliografia

1. SILVA RC. Biocombustíveis. *Biocombustíveis*. 2005:365-370.  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biocombustíveis#4>. Accessed January 19, 2015.
2. Pinto S. A viabilidade economico-social dos biocombustíveis em Portugal - Soluções político-legislativas. 2012.
3. Freitas S, Oliveira MJ. Produção e purificação de enzimas envolvidas na hidrólise de biomassas lignocelulósicas. 2011.
4. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. *Energy Convers Manag*. 2011;52(2):858-875.  
doi:10.1016/j.enconman.2010.08.013.
5. Gonçalves AR, Ribeiro M. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? 2001;24(2):247-251.
6. Peres E, Camargo JC, Sordi a., Santos a. MR. Recursos energéticos, meio ambiente e desenvolvimento. *MultiCiência*. 2003:1-22.
7. Etanol como combustível veicular. In: ; 2008.
8. Mussatto SI, Dragone G, Guimarães PMR, et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Adv*. 2010;28(6):817-830. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.
9. Canettieri E V. Obtenção dos Parâmetros e Estudo Cinético da Hidrólise Ácida dos Resíduos Florestais de Eucalipto. 2004:2004.
10. Nuno R, Carvalho L De. Dilute acid and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for biogas production. 2009.
11. Kiipper PG. Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus* . 2009.
12. Kohlhepp G. *Análise Da Situação Da Produção de Etanol E Biodiesel No Brasil*.; 2010:223-253. doi:10.1590/S0103-40142010000100017.
13. Teixeira J, Barros M, Martins L, Leitão J. Biorrefinarias e biotecnologia industrial. *Soc Port Biotechnol*. 2013.
14. Nascimento R. Contribuição ao desenvolvimento de processos químicos incentivados por micro-ondas para hidrólise em alta pressão de bagaço de cana. 2012.

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

15. Quilhó LFTL. Produção de Bioetanol a partir de Materiais Lenho-celulósicos de Sorgo Sacarino: Revisão Bibliográfica. 2011:1-70.
16. Chen WH, Ye SC, Sheen HK. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. *Appl Energy*. 2012;93:237-244. doi:10.1016/j.apenergy.2011.12.014.
17. Almeida CL De. Etanol Celulósico. 2012.
18. Moraes A. Otimização de meios de cultura para a produção de xilitol com base em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de azeitona extratado. 2012.
19. Wu Y, Fu Z, Yin D, et al. Microwave-assisted hydrolysis of crystalline cellulose catalyzed by biomass char sulfonic acids. *Green Chem*. 2010;12(4):696. doi:10.1039/b917807d.
20. Xu J, Chen H, Kádár Z, Thomsen AB, Schmidt JE, Peng H. Optimization of microwave pretreatment on wheat straw for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2011;35(9):3859-3864. doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.054.
21. Singh R, Tiwari S, Srivastava M, Shukla A. Microwave Assisted Alkali Pretreatment of Rice Straw for Enhancing Enzymatic Digestibility. *J Energy*. 2014;2014(0):1-7. doi:10.1155/2014/483813.
22. Stangherlin S. Vantagens e desvantagens das hidrólises enzimáticas e químicas na produção de bioetanol a partir do bagaço da cana de açúcar. 2009.
23. Suparno O, Prasetya B. Hydrolysis of Carbohydrates in Cassava Pulp and Tapioca Flour Under Microwave Irradiation. 2011;11(3):238-245.
24. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol*. 2010;101(13):4851-4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093.
25. Florencio C. Microrganismos Produtores de Celulases : Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp . 2011.
26. Alves J. Perspectivas de utilização da figueira-da-índia no Alentejo : caracterização de *Opuntia* sp . no Litoral Alentejano e na Tapada da Ajuda e estudo da instalação de um pomar. 2011.
27. Smedo A. Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*. 2012:140.
28. Martins SDC. Avaliação do potencial biológico de *Opuntia ficus-indica* (Figueira da Índia). 2011.  
<http://memberfiles.freewebs.com/85/97/82699785/documents/figo da india 3.pdf>.

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

29. Almeida J De. A palma forrageira na região semiárida do estado da Bahia: Diagnóstico, crescimento e produtividade. 2011.
30. Humberto J, Jesus G De. Extração e caracterização de óleo essencial de sementes de *Opuntia ficus indica*. 2014.
31. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. *Determination of Ash in Biomass*.; 2008.
32. Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. *Determination of Extractives in Biomass*.; 2008.
33. Galvani F, Gaertner E. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. *Circ Técnica*. 2006;4:1-9.
34. Sluiter A, Hames B, Ruiz RO, et al. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*.; 2004:1-14.
35. Castro A. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. 2009;33(1):181-188.
36. Selig M, Weiss N, Ji Y. *Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass*.; 2008.
37. Sluiter a, Hames B, Hyman D, et al. *Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples*.; 2008:3-5.
38. Sawaya WN, Khahlil JK, Al-mohammad M. Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus-indica*. 1983;33:91-97.
39. Majdoub H, Roudesli S, Deratani A. Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: Extraction, characterization and polyelectrolyte behaviour. *Polym Int*. 2001;50(November 2000):552-560. doi:10.1002/pi.665.
40. Habibi Y, Mahrouz M, Vignon MR. Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits. *Food Chem*. 2009;115(2):423-429. doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.034.
41. Ma H, Liu WW, Chen X, Wu YJ, Yu ZL. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresour Technol*. 2009;100(3):1279-1284. doi:10.1016/j.biortech.2008.08.045.
42. El Kossori RL, Villaume C, El Boustani E, Sauvaire Y, Méjean L. Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods Hum Nutr*. 1998;52:263-270. doi:10.1023/A:1008000232406.

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

## Anexos

A1. Tabelas de ANOVA com a comparação estatística com os resultados obtidos através dos ensaios preliminares realizados sobre a semente, com diferentes potências, volumes e tempos.

**Tabela 1 – Efeito do tempo utilizado no micro-ondas sobre a semente pré-tratada**

SUMMARY				
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
5 min	3	3,6818	1,227267	0,121968
10 min	3	3,799	1,266333	0,018062

ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0,002289	1	0,002289	0,032697	0,865298	<b>7,708647</b>
Within Groups	0,28006	4	0,070015			
Total	0,282349	5				

**Tabela 2 – Efeito da potência do micro-ondas sobre a semente**

SUMMARY				
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
539 W	3	3,6818	1,227267	0,121968
700 W	3	4,0905	1,3635	0,052895

ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0,027839	1	0,027839	0,318412	0,602702	<b>7,708647</b>
Within Groups	0,349727	4	0,087432			

Potencial dos Resíduos da Produção da Polpa de Figo da Índia e do Óleo das Sementes  
para a Produção do Bioetanol

Tabela 3 – Efeito do volume na utilização do micro-ondas sobre a semente

SUMMARY				
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
250 mL	3	3,9066	1,3022	0,182758
125 mL	3	3,6818	1,227267	0,121968

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0,008423	1	0,008423	0,055279	0,825665	<b>7,708647</b>
Within Groups	0,609452	4	0,152363			
Total	0,617874	5				

Tabela 21feito do volume na utilização do micro-ondas sobre a semente

SUMMARY				
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
500 mL	3	4,4667	1,4889	0,199353
125 mL	3	3,799	1,266333	0,018062

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0,074304	1	0,074304	0,683521	0,454842	<b>7,708647</b>
Within Groups	0,43483	4	0,108708			
Total	0,509134	5				